Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung des "Potato Spindle Tuber" Viroids (PSTV) mit Hilfe von DNA- und RNA-Konstrukten

Dissertation

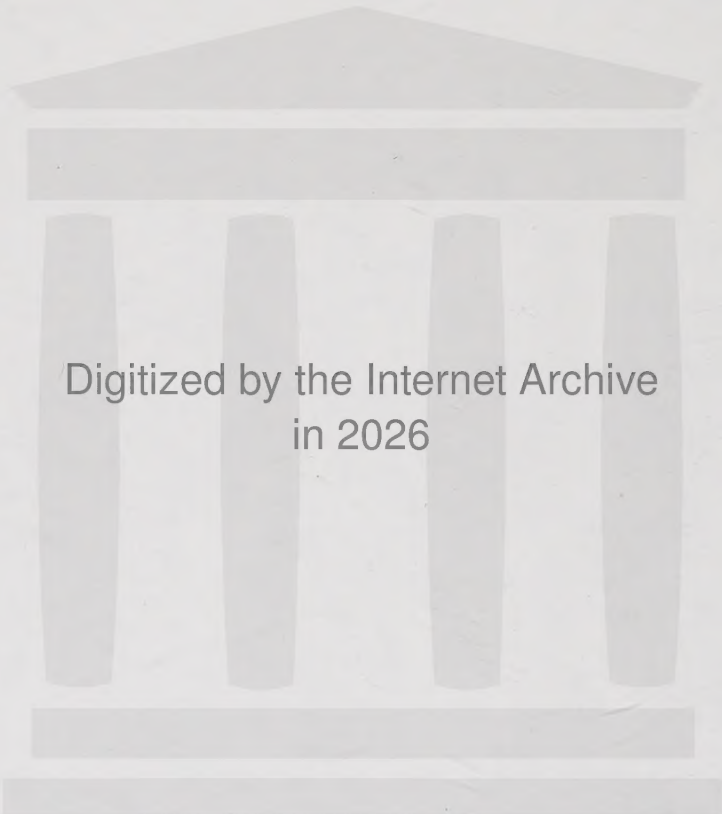
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Martin Tabler
aus Stuttgart

1986


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0007

Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung des "Potato Spindle Tuber" Viroids (PSTV) mit Hilfe von DNA- und RNA-Konstrukten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Martin Tabler
aus Stuttgart

1986

Tag der mündlichen Prüfung : 18. 12. 1986

Dekan : Prof. Dr. W. Engels

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H.L. Sänger

2. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Seyffert

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Heinz L. Sänger am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung Viroidforschung durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Sänger für das Thema, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die großzügige Unterstützung bei der Beschaffung von Arbeitsmaterialen, seinem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie die Anregung und Beratung in vielen hilfreichen und motivierenden Diskussionen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Viroidforschung möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken. Besonders danke ich Frau Dipl.-Chem. Mina Tsagris für die hervorragende Kooperation bei der Planung und Durchführung von Experimenten im Zusammenhang mit der Viroid-RNA-Prozessierung. Darüberhinaus bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner "Labornachbarin" Frau Dipl-Biol. Gertrud Kütemeier, sowie bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Mühlbach für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen. Herrn Dipl.-Chem. Bernd Haas danke ich für die Bereitstellung eines Computer-Grafik Progammes. Bei den ehemaligen "Tübinger Studenten" Waltraud Schmidt, Manuela Zweimüller und Holger Puchta bedanke ich mich für ihre engagierte Mitarbeit.

Bei Frau Ramm, Frau Bauer und Frau Barkic bedanke ich mich für die Durchführung der zahlreichen Infektiositätstests und bei allen Mitarbeitern des Gewächshauses für die Bereitstellung von mitunter riesigen Mengen an Testpflanzen, sowie deren sorgfältiger Pflege.

Bei Herrn Wittenzeller und seinen Kollegen der zentralen Werkstätten des Max-Planck-Institutes für Biochemie bedanke ich mich für den Bau von hervorragenden Geräten und Laborhilfsmittel aller Art.

Besonders herzlich danke ich Frau Kleinhans, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit "Berge" von Glassachen gespült hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Isolde Günther, die seit Juli 1984 bei der Durchführung nahezu aller Experimente maßgeblich beteiligt war. Sie hat nicht nur durch ihre umsichtige und sorgfältige Arbeitsweise, sowie ihr Interesse an der Thematik, sondern auch durch ihre ständige Bereitschaft neue Arbeitsmethoden zu etablieren oder zu verbessern, ganz wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. W. Seyffert, für seine Bereitschaft, die Arbeit zu betreuen.

Schließlich danke ich der Max-Planck-Gesellschaft für die Gewährung eines Stipendiums und die großzügige Unterstützung bei Kongreßreisen.

Teile dieser Arbeit sind bislang in folgende Publikationen eingegangen :

Tabler,M. und Sänger,H.L. (1984).
Cloned single- and double-stranded DNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTV) and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious.
EMBO J., 3, 3055-3062.

Tabler, M. und Sänger, H.L., (1985).
Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with the SP6 transcription system.
EMBO J., 4, 2191-2199.

Tabler,M. Schnölzer,M. und Sänger,H.L. (1985).
Molecular cloning of potato spindle tuber viroid (PSTV) cDNA synthesized by enzymatic elongation of PSTV-specific cDNA primers: A general strategy for viroid cloning.
Biosci. Rep., 5, 143-158.

Spiesmacher,E., Mühlbach,H.-P., Tabler,M. und Sänger,H.L. (1985).
Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors.
Biosci. Rep., 5, 251-265.

Abkürzungen

1. EINLEITUNG 1

2. ZIELE DER ARBEIT 7

3. MATERIALIEN 9

3.1 Vorbemerkungen 9

3.2 Enzyme und Proteine 9

3.3 Medien 10

3.4 Reagenzien 12

3.5 DNA-Oligonukleotide 13

3.6 Radiochemikalien 14

3.7 Puffer und Phenollösungen 15

3.8 Säulenmaterialien 16

3.9 E.coli-Stämme 16

3.10 DNA-Vektoren 17

3.11 Weitere Materialien 17

3.12 Geräte 17

4. METHODEN 19

4.1 Enzymatische Reaktionen 19

4.1.1 DNA-Ligase 19
4.1.2 Phosphatase 19
4.1.3 ^{32}P-Markierung von DNA-Fragmenten mit T_4-Polynukleotidkinase 20
4.1.4 Überführung von überstehenden 5'-Enden in glatte Enden mit Klenow-Enzym 21
4.1.5 Überführung von überstehenden 3'-Enden in glatte Enden mit T_4-DNA-Polymerase 21
4.1.6 Einzelstrangabbau mit Nuklease S1 22
4.1.7 Herstellung DNase-freier RNase A, und deren Anwendung 22
4.1.8 DNase I 23
4.1.9 Transkription mit SP6-RNA-Polymerase 23

4.2 Nukleinsäurefällungsmethoden 25

4.2.1 Äthanolfällung 25
4.2.2 Isopropanolfällung 26

4.3 Abtrennung von niedermolekularen radioaktiven Molekülen durch Gelfiltration 28

4.4 Markierung von PSTV-RNA mit ^{125}J 29

4.5 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen 30

4.6 Transformation 31

4.7 Zellaufschluß und Fixierung auf Nitrocellulosefiltern zur Kolonie-Hybridisierung 32

4.8 E.coli-Dauerkulturen 33

4.9 Transfektion und Anzucht von M13-Phagen 34

4.10 Isolierung von Vektor-DNA 34

4.10.1 "Mini"-Präparation von Plasmid- oder doppelsträngiger M13-Phagen-DNA 34
4.10.2 Präparative Gewinnung von Plasmid- oder doppelsträngiger M13-Phagen-DNA 36
4.10.3 Gelfiltration mit Sephacryl S 1000 39

4.11 Trennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese 40

4.11.1 Agarosegel-Elekrophorese 40
4.11.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese 41
4.11.3 Sequenzierungsgele 43

4.12 Nachweis von Nukleinsäure-Banden in Gelen 46

4.12.1 Ethidiumbromidfärbung 47
4.12.2 Silberfärbung 47
4.12.3 Autoradiographie 48

4.13 Restriktionsanalysen 48

4.13.1 Verdau mit Restriktionsenzymen 49
4.13.2 Verwendete Gelsysteme zur Auftrennung der Restriktionsfragmente 49
4.13.3 Eichkurven zur Längenbestimmung 49
4.13.4 Marker für die Gelanalysen 49

4.14 Elution von Nukleinsäuren aus Gelen mittels Isotachophorese 50

4.15 Glyoxalierung von Nukleinsäuren 53

4.16 "Dot Blotting" 53

4.17 "Northern Blotting" 55

4.17.1 Transfer von Nukleinsäuren durch "Electroblotting" 55
4.17.2 Molekulare Hybridisierung 56

4.18 Hybridisierung von RNA in Lösung 57

4.19 Infektiositätstests mit PSTV-cDNA und PSTV-RNA 58

4.20 Aufreinigung von DNA-Oligonukleotiden 58

4.21 Mutagenese von PSTV-DNA 61

4.22 DNA-Sequenzierung nach der Maxam-Gilbert-Methode 67

4.23 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode 68

4.24 Markierung von M13-DNA als Hybridisierungsprobe 69

4.25 Sequenzierung von PSTV-RNA aus Einzelpflanzen 70

4.25.1 Gewinnung eines Nukleinsäure Gesamt-Extraktes aus Tomatenblättern 70
4.25.2 Gewinnung einer für die reverse-Transkription geeigneten PSTV-RNA-Fraktion aus Gesamt-Nukleinsäureextrakt 71
4.25.3 Herstellung von endmarkierten DNA-Primern aus klonierter PSTV-DNA zur Synthese von Viroid-cDNA 72
4.25.4 Gewinnung von endmarkierter PSTV-cDNA 74

5. ERGEBNISSE 76

5.1 Konstruktion von PSTV-DNA-Klonen 76

5.1.1 Definition von Polarität der PSTV-DNA 81
5.1.2 Definition der Insertionsorientierung der PSTV-DNA 81
5.1.3 Konstruktion von PSTV-DNA Subklonen in Bakteriophage M13 oder in Plasmid pBR322 83
5.1.4 Übersicht über die verwendeten Bakteriophagen-kodierten Transkriptionssysteme und deren Vektoren 88
5.1.5 Konstruktion von monomeren und oligomeren PSTV-DNA-Subklonen in SP6-Vektoren 89
5.1.6 Konstruktion von PSTV-DNA Subklonen in SP6-Vektoren mit langen duplizierten Bereichen 102
5.1.7 Konstruktion von PSTV-DNA Subklonen in SP6-Vektoren mit kurzen duplizierten Bereichen innerhalb der zentralen konservierten Region 117

5.2 Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase 121

5.3 Infektiositätsstudien mit klonierten DNAs des PSTV-Isolates KF440-2 124

5.3.1 Infektiositätstests von vollständigen doppelsträngigen PSTV-DNA-Genomen 125
5.3.2 Infektiositätstests von doppelsträngigen subgenomischen PSTV-DNA-Fragmenten 128
5.3.3 Infektiositätstests mit einzelsträngiger PSTV-DNA 130

5.3.4 Induktion der in vivo Synthese von PSTV-RNA nach Inokulation mit PSTV-DNA 132

5.4 Infektiositätsstudien mit RNA-Transkripten von klonierten DNAs des PSTV-Isolates KF440-2 138

5.4.1 Infektionstests mit RNA aus Escherichia coli 138
5.4.2 Infektionstests mit monomeren und oligomeren SP6-RNA-Transkripten von PSTV-DNA 140
5.4.3 Infektionstests mit partiell duplizierten SP6-RNA-Transkripten von PSTV-DNA 144

5.5 Gezielte Mutagenese der PSTV-DNA 151

5.5.1 Prinzip und Strategie der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese 152
5.5.2 Durchführung der gerichteten Mutagenese der PSTV-DNA 157
5.5.3 Die Mutagenese der PSTV-DNA und die Infektiosität der mutierten PSTV-RNAs 158

5.6 Sequenzierung von PSTV-RNA aus Einzelpflanzen 169

6. DISKUSSION 171

6.1 Infektionsstudien mit genomischen und subgenomischen Einheiten von PSTV-DNA und PSTV-RNA 171

6.1.1 Infektiosität von oligomeren doppel- und einzelsträngigen PSTV-DNAs 171
6.1.2 Infektiosität von einzel- und doppelsträngigen, Vektor-insertierten, monomeren PSTV-DNAs 174
6.1.3 Infektionsverhalten des (+) orientierten monomeren BamHI-Klones M13-40(+) 176
6.1.4 Infektiosität von monomeren oder subgenomischen PSTV-Doppelstrang-DNAs ohne Fremdsequenzen 177
6.1.5 Infektiosität von monomeren und oligomeren PSTV-RNAs von (+) und (-) Polarität 179
6.1.6 Warum sind die oligomeren PSTV (-) RNAs nicht infektiös ? 181
6.1.7 Modell des PSTV-Infektionsweges nach mechanischer Inokulation von klonierten PSTV-DNAs und ihren RNA-Transkripten 186

6.2 Analyse der Bereiche des PSTV-Genoms, die zur Prozessierbarkeit und Infektionsfähigkeit dupliziert sein müssen 190

6.2.1 Die Prozessierung der PSTV-RNA 190
6.2.2 Infektionstests mit PSTV-RNAs mit langen duplizierten Bereichen 194
6.2.3 Infektionstests der PSTV-RNAs mit kurzen duplizierten Bereichen 194
6.2.4 Untersuchungen über den Einfluß von Punktmutationen auf Replikation und Pathogenität von PSTV-RNA 197

6.3 Resümee und Perspektive 202

7. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT 203

8. LITERATURVERZEICHNIS 205

LEBENSLAUF 223

Abkürzungen

Abb	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Bis(acrylamid)	N,N' Methylenbisacrylamid
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
DMSO	Dimethylsufoxid
ds DNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4 Dithiothreit
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure (Tritiplex III)
ES	Erkennungssequenz
EtBr	Ethidium-Bromid
gdDNA	gapped duplex DNA
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalakto-pyranosid
NTA	Nitrilotriessigsäure
(d)NTP	(Desoxy-) Nukleosid-Triphosphat
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PIPES	Piperazin-N,N'-bis (2-äthansulfonsäure)
PSTV	Potato Spindle Tuber Viroid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N' Tetramethyläthylendiamin
ss DNA	einzelsträngige DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
upm	Umdrehungen pro Minute
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid

1. EINLEITUNG

Die Viroide sind eine neue Klasse von subviralen infektiösen Krankheitserregern, die man bisher nur bei höheren Pflanzen gefunden hat. Sie verursachen Krankheiten mit zum Teil verheerenden Symptomen und wirtschaflichen Schäden bei Kartoffeln, Tomaten, Zitrusgewächsen, Kokospalmen, Chrysanthemen, Gurken, Hopfen, Avocado und auch bei Wein (siehe als neuere Übersichten Sänger, 1982; 1984; Diener, 1984; Riesner und Gross, 1985). Seit der Entdeckung der Viroide vor etwa 15 Jahren wurden ein gutes Dutzend Pflanzenkrankheiten beschrieben, die auf Viroidbefall zurückzuführen sind (Tabelle 1). Nachdem festgestellt wurde, daß Viroide Hüllprotein-freie und zirkuläre RNAs sind (Sänger et al., 1976), gelang es im Jahre 1978 erstmals die gesamte Struktur, d.h. die Sequenz, eines Viroides aufzuklären (Gross et al., 1978). Dabei zeigte sich, daß das Genom des Viroides der Kartoffelspindelknollensucht (pototo spindle tuber viroid = PSTV) aus einer einzelsträngigen, kovalent geschlossenen und daher zirkulären RNA von 359 Nukleotiden besteht (siehe als Übersicht Sänger,1979). Inzwischen wurden 9 weitere Viroide sequenziert (Tabelle 1), die eine Kettenlänge zwischen 246-574 Nukleotiden aufweisen. Sie sind daher die kleinsten sich autonom replizierenden Nukleinsäuren, die in der Natur vorkommen.

Alle bisher bekannten Viroidsequenzen weisen einen hohen Grad an intramolekularer Selbstkomplementarität auf. Daher nimmt das einzelsträngige zirkuläre RNA-Molekül in seiner thermodynamisch günstigsten Struktur eine für Viroide charakteristische stäbchenförmige Gestalt an. In dieser Sekundärstruktur liegen ca 70% der Nukleotide basengepaart vor. Die doppelsträngigen Bereiche sind jedoch relativ kurz und werden stets durch ungepaarte Nukleotide voneinander getrennt, die kleine Ausstülpungen und Schleifen ("loops" und "hairpins") bilden (Riesner et al., 1979, 1983). So sind zB beim PSTV, dem bestcharakterisierten Viroid, 26 doppelsträngige Bereiche durch 25 Segmente von ungepaarten Regionen unterbrochen. Die längsten doppelsträngigen Bereiche bestehen hier aus maximal 9 Nukleotiden. An den

beiden Enden des PSTV-"Stäbchens" befindet sich jeweils ein basengepaarter terminaler hairpin (siehe Abb. 1)

Es ist erstaunlich, daß alle Viroide eine sehr ähnliche Sekundärstruktur annehmen können, obwohl sie sich teilweise in der Sequenz ihrer Nukleotide sehr unterscheiden. Aufgrund des Grades ihrer Sequenzhomologie kann man die Viroide in vier Gruppen einordnen. Gemeinsam mit dem PSTV gehören die vier Viroid-Arten CEV, CSV, TASV und TPMV, die jeweils über 70 % Sequenzhomologie zum PSTV aufweisen, zur "PSTV-Gruppe" (siehe Tabelle 1). Zur HSV-Gruppe gehört, neben dem HSV, das nahezu identische GV, sowie das CPFV. Diese Viroide besitzen ca 55 % Sequenzhomologie zu PSTV. Das CCCV und das ASBV sind jeweils Vertreter einer eigenen Gruppe, da sie nicht untereinander verwandt sind und zum PSTV lediglich 18 bzw 11 % Seqeuenzhomologie aufweisen. Man muß annehmen, daß die Viroide bestimmter Gruppen entweder von unterschiedlicher Herkunft sind, oder sich in unterschiedlicher Weise entwickelt haben.

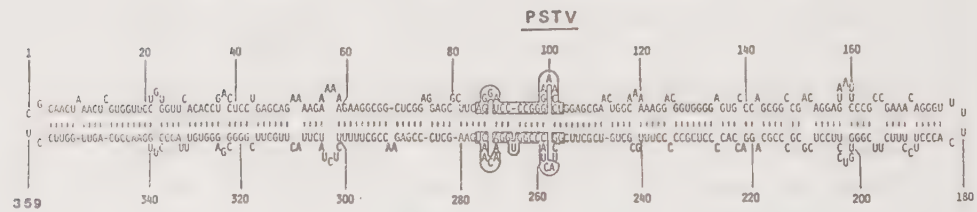


Abbildung 1: Sequenz der 359 Nukleotide der PSTV-RNA in ihrer thermodynamisch stabilsten Sekundärstruktur.

Das PSTV-Molekül nimmt in der gezeigten Struktur eine stäbchenförmige Gestalt an, in der kurze doppelsträngige Bereiche von ungepaarten Regionen unterbrochen werden. Die willkürlich festgelegte Numerierungsgrenze des zirkulären Moleküles 359/1 befindet sich im "linken" terminalen "loop".

Im mittleren Bereich des PSTV-Stäbchens ist die sogenannte "zentrale konservierte Region" durch Einrahmung der Sequenz gekennzeichnet. Dieser Bereich ist mit Ausnahme des ASBV bei allen Viroiden weitgehend konserviert. Der Bereich zwischen den Nukleotiden 85-104 wird als "obere zentrale konservierte Region" bezeichnet und der Bereich zwischen den Basen 254-277 entsprechend als "untere zentrale konservierte Region".

Tabelle 1:
Übersicht über die gegenwärtig bekannten Viroide und die Pflanzenkrankheiten, die sie verursachen

Viroidbezeichnung (Pflanzenkrankheit)	Abk.	Zahl der Nukleotide	Literatur
Potato Spindle Tuber Viroid (Kartoffelspindelknollensucht)	PSTV	359	Gross et al.,1978
Citrus Exocortis Viroid (Exocortiskrankheit von Zitrone)	CEV	371-375	Gross et al.,1982 Visvader et al.,1982 Visvader und Symons,1985
Chrysanthemum Stunt Viroid (Staucherkrankheit der Chrysantheme)	CSV	354,356	Haseloff und Symons,1981 Gross et al.,1982
Tomato Planta Macho Viroid (Tomato Planta Macho Krankheit)	TPMV	360	Kiefer et al.,1983
Tomato Apical Stunt Viroid (Triebstauche der Tomate)	TASV	360	Kiefer et al.,1983
Hop Stunt Viroid (Hopfen-Stauchekrankheit)	HSV	297	Ohno et al.,1983
Cucumber Pale Fruit Viroid (Gelbfrüchtigkeit der Gurke)	CPFV	303	Sano et al.,1984
Grapevine Viroid (Blattrollrankheit der Weinrebe)	GV	297	Sano et al.,1986
Coconut Cadang Cadang Viroid (Cadang-Cadang-Krankheit der Kokospalme)	CCCV	246-574	Haseloff et al.,1982
Avocado Sunblotch Viroid (Avocado-Sonnenfleckigkeit)	ASBV	247	Symons,1981
Tomato Bunchy Top Viroid (Wuschelköpfigkeit der Tomate)	TBTV	?	McClean,1931 Walter,1981
Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (Chlorotische Blattflecken-krankheit der Chrysantheme)	CCMV	?	Romaine und Horst,1975
Burdock Stunt Viroid (Kletten-Stauchekrankheit)	BSV	?	Chen et al.,1983

Interessanterweise besitzen jedoch alle Viroide, mit der Ausnahme des ASBV, trotz der mitunter stark abweichenden Primärsequenzen zwei Molekülbereiche, die unter allen Viroiden hoch konserviert sind. In der thermodynamisch stabilsten Sekundärstruktur liegen diese beiden konservierten Bereiche genau gegenüber und gehen miteinander Basenpaarungen ein. Bezogen auf das Sekundärstrukturmodell der Viroid-RNA liegt diese konservierte Moleküldomäne ziemlich genau in der Mitte des Stäbchens. So erstreckt sich zB beim PSTV die sogenannte "obere zentrale konservierte Region" über 20 Nukleotide zwischen Nukleotid A_{85} bis Nukleotid U_{104}. Die dazugehörige "untere zentrale konservierte Region" reicht von Nukleotid G_{254} bis U_{277} (siehe Abb. 1). Es ist erwähnenswert, daß die obere zentrale konservierte Region nahezu palindromisch ist, mit einer Symmetrieachse zwischen den zentralen Nukleotiden C_{94} und G_{95}. Die genannten Molekülbereiche treten bei verschiedenen Viroid-Arten, mit Ausnahme des ASBV, an der gleichen Position auf und sind in ihrer Sequenz weitgehend identisch, obwohl die entsprechenden Viroide sich auf so unterschiedlichen Wirtspflanzen, wie zB Tomate und Kokospalme vermehren. Dies deutet darauf hin, daß diese Moleküldomäne offenbar eine für die Viroidvermehrung essentielle Funktion ausübt.

Trotz der genauen Kenntnis der Struktur der Viroide, sowie ihrer thermodynamischen Eigenschaften, ist noch relativ wenig über ihre biologische Funktion bekannt. In den letzten Jahren konnte die intrazelluläre Lokalisation der Viroide geklärt werden. So kommt in infizierten Wirtszellen das PSTV im Zellkern vor (Takahashi und Diener, 1975) und dort überwiegend in den Nukleoli (Schumacher et al., 1983). Im Falle des PSTV konnte zudem nachgewiesen werden, daß der Zellkern der Ort der Replikation ist (Spiesmacher et al., 1985). Es existieren jedoch zwei Viroide, die von diesem Verhalten abzuweichen scheinen. Das Cadang Cadang Viroid der Kokospalme (CCCV), sowie das Sunblotch Viroid von Avocado (ASBV) sollen nämlich vorwiegend in den Chloroplasten vorkommen (Randles et al., 1976; Mohamed und Thomas, 1980).

Es gibt bisher keinerlei Hinweise dafür, daß das RNA-Genom der Viroide zur Kodierung eines Peptides dient. Dagegen spricht nicht nur der geringe potentielle genetische Informationsgehalt der Viroid-RNA,

sondern auch das Fehlen des eukaryontischen Initiatorcodons AUG z.B. auf der Sequenz des PSTV, das dort weder bei der akkumulierenden (+) Viroid-RNA, noch bei der dazu komplementären Viroid (-) RNA vorkommt. Es fehlen weiterhin potentielle Ribosomenbindungsstellen und schließlich haben auch entsprechende in vitro Translationsexperimente mit Viroid (+) und (-) RNAs zu keinerlei Peptidprodukten geführt. Man kann daher davon ausgehen, daß die Viroide zu ihrer Replikation ausschließlich wirtseigene Proteine nutzen. Durch Hemmungsversuche mit alpha-Amanitin konnte gezeigt werden, daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase II höchstwahrscheinlich an der Viroidreplikation in vivo beteiligt ist und die infizierende (+) RNA in die entsprechende (-) Form "transkribiert" (Mühlbach und Sänger, 1979). Die isolierte RNA-Polymerase II ist darüberhinaus auch in der Lage, die entsprechende Transkription von Viroid (+) RNA in ihre komplementäre (-) Form in vitro durchzuführen (Rackwitz et al., 1981). Möglicherweise ist in vivo ebenfalls die nukleoläre RNA-Polymerase I bei der Viroidreplikation beteiligt, nämlich bei der sich anschließenden Transkription von (-) nach (+) RNA (Spiesmacher et al., 1985).

Während die Rolle der beteiligten Wirtsenzyme bei der Replikation noch nicht abschließend geklärt ist, kennt man die intermediären Replikationsprodukte der Viroide recht genau. Durch molekulare Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, daß die zirkuläre Viroid-RNA in vivo in lange, d.h. oligomere (-) Formen transkribiert wird, wofür ein Mechanismus postuliert wurde, der dem sogenannten "rolling circle" Mechanismus vergleichbar ist (Branch und Robertson, 1984). Die oligomeren (-) Formen werden in einem zweiten Replikationsschritt in oligomere RNAs von (+) Polarität überführt (Spiesmacher et al., 1983) und schließlich in einer Prozessierungsreaktion zurechtgeschnitten und zu den monomeren (+) Viroid Ringmolekülen ligiert, die sich in der Zelle ansammeln. Es ist jedoch weitgehend unbekannt, wie diese Replikationsschritte im einzelnen vor sich gehen.

Eine andere wesentliche Problemstellung ist die Frage, weshalb, bzw auf welche Weise, die Viroide bei ihrer Replikation die eigentliche Krankheit auf ihren Wirtspflanzen auslösen. Zur ersten Analyse des Pathogenitätsmechanismus wurde die Primärstruktur von unterschiedlich pathogenen Feldisolaten des PSTV miteinander verglichen (Schnölzer et

al., 1985; Schnölzer-Rackwitz, 1985). Dabei ergab sich, daß unterschiedlich pathogene PSTV-"Stämme" sich auf molekularer Ebene in nur einigen wenigen Nukleotidaustauschen in einer ganz bestimmten Domäne innerhalb des PSTV-Moleküls unterscheiden. Diese geringen Variationen bewirken jedoch eine nachhaltige Änderung des Symptombildes, das diese PSTV-Varianten bei den entsprechenden Wirtspflanzen hervorufen. So existieren Varianten von PSTV, die allesamt voll replikationsfähig sind und dabei abhängig vom jeweiligen Isolat entweder gar keine, schwache, mittlere oder starke Krankheitssymptome auf ihrer Wirtspflanze Tomate auslösen. Die phänotypischen Auswirkungen der "Mutationen" bei diesen unterschiedlich virulenten PSTV-Isolaten konnte korreliert werden mit der Veränderung der thermodynamischen Stabilität einer bestimmten Domäne des Viroidmoleküls. Der entsprechende Molekülbereich wurde als sogenannte "Virulenz modulierende" Region (VM-Region) bezeichnet. Es hat sich gezeigt, daß alle bisher in der Natur gefundenen Mutationen des PSTV die Flexibilität in der VM-Region beeinflussen, während die übrigen Bereiche des Moleküls hinsichtlich ihrer Sequenz und damit in ihrer Stabilität weitgehend konserviert sind. Dieser empirisch abgeleitete Befund erlaubt es nun, gezielt diejenigen Wirtskomponenten zu suchen, die mit den unterschiedlich flexiblen VM-Regionen der verschiedenen PSTV-Mutanten in Wechselwirkung treten können.

Angesichts dieser Situation ist es ein zentrales Anliegen der gegenwärtigen Viroidforschung, Einblick in die molekularen Mechanismen der Viroid-Replikation und Krankheits-Induktion zu erhalten. Dabei geht es in erster Linie darum, herauszufinden, auf welche Weise die Viroid-RNA-Moleküle mit zellulären Enzymen wechselwirken, um ihre eigene Replikation zu bewerkstelligen, wie sie ihren Wirtsbereich bestimmen und wie sie ihre pathogenen Effekte auf entsprechenden Wirtspflanzen auslösen. Da keine Viroid-spezifische Translationsprodukte existieren, müssen die dazu erforderlichen Informationen in der Viroidstruktur selbst, das heißt, letztendlich in ihrer Sequenz, verankert sein.

2. ZIELE DER ARBEIT

Gentechnologische Methoden sollten verwendet werden, um die Beziehung zwischen der molekularen Struktur der Viroide und ihren biologischen Eigenschaften, insbesondere ihrer Replikabilität und Pathogenität zu untersuchen. Dabei stand die von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit klonierte cDNA des PSTV-Isolates KF440-2 zur Verfügung. Folgende Problemstellungen sollten daher bearbeitet werden :

(1) Ausgehend von klonierter PSTV-DNA sollte eine Hybridisierungsprobe entwickelt werden, die zum analytischen Nachweis von PSTV geeignet war. Darüberhinaus sollte sie mit hoher Spezifität und Sensitivität auch geeignet sein, strangspezifisch zwischen den Replikationsintermediären von (+) und (-) Polarität zu unterscheiden. Dies ist eine Grundvoraussetzung zur Untersuchung der verschiedenen Replikationsschritte der Viroid-RNA.

(2) Es galt festzustellen, ob klonierte Viroid-cDNA in der Lage ist, nach mechanischer Inokulation auf Tomate dort eine Viroidinfektion hervorzurufen, obwohl in vivo eine solche Viroid-spezifische DNA nicht existiert, da der Replikationsweg der Viroide ausschließlich über RNA erfolgt (Branch und Dickson, 1980; Zaitlin et al., 1980; Rohde und Sänger, 1981; Hadidi et al., 1981).

(3) Es sollte geprüft werden, ob künstlich eingeschleuste PSTV-DNA sich in der Wirtspflanze replizieren kann.

(4) Es sollte untersucht werden, welche Voraussetzungen gegebenenfalls nötig sind, damit eine klonierte Viroid-DNA infektiös ist.

(5) Es sollte versucht werden, ausgehend von der klonierten PSTV-DNA, in vitro RNA zu synthetisieren. Dabei sollten insbesondere oligomere RNAs synthetisiert werden, die den Replikationsintermediären der Viroide entsprechen. Solche Moleküle wurden zwar

in vivo durch molekulare Hybridisierung nachgewiesen, sie konnten aber wegen ihrer geringen Konzentration bisher noch nicht isoliert werden. Neben dem Nachweis ihrer Infektiosität auf den entsprechenden Wirtspflanzen sollte untersucht werden, inwieweit diese synthetischen PSTV-RNAs auch zum Studium der Replikation und der "Reifung" in vitro eingesetzt werden können. Gegebenenfalls sollten die strukturellen Voraussetzungen für die Prozessierung der Viroid-RNA studiert werden, d.h. das spezifische Herausschneiden eines monomeren PSTV-Moleküls aus einer oligomeren Form und die sich daran anschließende Ligation zum zirkulären Endprodukt.

(6) Schließlich sollte versucht werden, die molekulare Struktur der Viroide gezielt zu verändern. Damit sollten die Voraussetzungen geschaffen werden, um die physikalischen und gegebenenfalls auch die biologischen Auswirkungen dieser Eingriffe in die molekulare Struktur zu analysieren.

3. MATERIALIEN

3.1 Vorbemerkungen

Die vorliegende Dissertation wurde mit Hilfe des Textverarbeitungssystemes "RESY" am Max-Planck-Institut für Biochemie erstellt. Dieses bedingt die Gestaltung der äußeren Form der vorliegenden Arbeit. Da keine griechischen Buchstaben verfügbar sind, wurden µl, µg und µM durch ul, ug und uM ersetzt.

Bei dem Themengebiet, das bearbeitet wurde, dominiert die englischsprachige Literatur. Somit sind für viele fachspezifische Termini keine äquivalenten deutschen Ausdrücke gebräuchlich. Die Übersetzung bereitet unter Umständen Schwierigkeiten, da sie im Deutschen einen anderen Akzent erhalten kann. So bedeutet zB Restriktions-"verdau" (engl. : digestion) nicht, daß die DNA abgebaut, sondern lediglich geschnitten wird. Andere international gebräuchliche Fachwörter zB "Linker" und "Primer" wurden nicht ersetzt.

3.2 Enzyme und Proteine

Die Restriktionsendonukleasen stammten von verschiedenen Herstellern. Die übrigen Enzyme wurden bei folgenden Herstellern bezogen :

Boehringer, Mannheim :

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm;

Lysozym aus Hühnereiweiß;

RNase A aus Rinderpankreas;

Gibco-BRL, Eggenstein:
M-MLV-reverse-Transkriptase (aus Moloney Murine Leukemia Virus);
Ribonuklease Inhibitor = RNasin;
Rinderserumalbumin, nukleasefrei;

Life Sciences, St Petersburg, USA :
AMV-reverse-Transkriptase (aus aviärem Myeloblastose Virus);

New England Biolabs, Schwalbach bei Frankfurt :
DNA-Polymerase I- großes Fragment aus E.coli (Klenow-Enzym);
T_4-DNA Ligase;

NEN, Dreieich :
T_4-DNA-Polymerase;

Pharmacia, Freiburg :
Nuklease S1 aus Aspergillus oryzae;
T_4-Polynukleotidkinase;

Renner, Dannstadt :
DNA-Polymerase I- großes Fragment aus E.coli (Klenow-Enzym);
DNaseI (RNase-frei);
SP6-RNA-Polymerase;
T_4-DNA-Ligase;

3.3 Medien

Grundstoffe für Medien wurde von Gibco, Karlsruhe bezogen :

Caseinhydrolysat Peptone No 20;
Hefe Extrakt;
Agar (bacteriological grade);

Zusammensetzung der verwendeten Medien :

Vollmedium :	Caseinhydrolysat	10 g
	Hefe Extakt	5 g
	NaCl	10 g
	Glucose	1 g
		ad 1 l

Mit 1 n NaOH wurde ein pH Wert von 7,2 eingestellt und bei 120°C für 40 Minuten autoklaviert.

Agarplatten wurden mit dem gleichen Medium hergestellt, das jedoch zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar enthielt (Giessen der Platten bei ca 40°C). Der Weichagar für das Ausplattieren von M13-Phagen enthielt nur 0,5% Agar.

M9 Medium :	850	ml Wasser
	100	ml 10 x M9 Salze
	1	ml Mg_2SO_4 1 M
	0,1	ml $CaCl_2$ 1 M
	20	ml Caseinhydrolysat (20 % w/v)
	20	ml Glucose (20 % w/v)
		ad 1 l

10 x M9 Salze :	80 g	Na_2HPO_4
	20 g	KH_2PO_4
	5 g	NaCl
	5 g	NH_4Cl
		ad 1 l

Bei Bedarf wurden den Medien unmittelbar vor Benutzung Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt :

Ampicillin :	100 ug/ml
Tetracyclin :	13 ug/ml

Bei Farbindikatorplatten erfolgte der Zusatz von 30 mg X-gal und 12 mg IPTG.

3.4 Reagenzien

Die üblichen Laborchemikalien stammten von Merck, Darmstadt; Für spezielle Zwecke wurden Reagenzien folgendender Herkunft eingesetzt :

Für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980) :

"Carrier-DNA" : Kalbsthymus DNA Typ I, Sigma, München; oder selbst isolierte M13mp8 DNA;
Piperidin, grade I, Sigma, München;
"Carrier RNA" : tRNA aus E.coli MRE 600, RNase-negativ, Boehringer, Mannheim;
Dimethylsulfat zur Synthese : Merck-Schuchart;
Ameisensäure, p.a.: Merck;
Natriumkakodylat x 3 H_2O: Fluka;
Hydrazin, wasserfrei purum: Roth, Karlsruhe;
2 Mercaptoäthanol puriss. p.a.: Roth, Karlsruhe;

Für Polyacrylamidgele einschließlich Sequenzierungsgele wurden von BioRad, München bezogen :
Acrylamid, Bisacrylamid, TEMED, Ammoniumpersulfat;

Weitere spezielle Regenzien :
Agarose, "electrophoresis grade": Gibco-BRL, Eggenstein;
Agarose "low melting point, electrophoresis grade": Gibco-BRL, Eggenstein;
epsilon- Amino-Capronsäure: Sigma, München;
Antibiotika: Sigma, München;
BSA, Nukleasefrei: Gibco-BRL, Eggenstein;
BSA (A-7638), zu Hybridiserungszwecken: Sigma, München;
(Desoxy-) Ribo-Nukleosid-Triphosphate: Boehringer, Mannheim;

Didesoxy-Ribo-Nukleosid-Triphosphate: Pharmacia, Freiburg;
DMSO (Uvasol): Merck, Darmstadt;
Ethidiumbromid: Boehringer, Mannheim;
Ficoll 400: Pharmacia, Freiburg;
Formamid für Auftragspuffer und Hybridisierung in Lösung: Gibco-BRL, Eggenstein;
Formamid nach zweimaligem Umkristallisieren für Hybridisierungszwecke von "Blots": Merck;
G(5')ppp(5')G: Pharmacia, Freiburg;
gamma-Methacryloxypropyltrimethylsilan, (Silan GF 31): Wacker Chemie, München;
IPTG: Biomol, Ilvesheim;
PIPES: Serva Heidelberg;
Polyvinylpyrrolidon: Sigma, München;
Rotiszint 22: Roth Karlsruhe;
X-gal: Biomol, Ilvesheim;

3.5 **DNA-Oligonukleotide**

Der Universal-Sequenzierungsprimer stammte von Boehringer Mannheim; Die PSTV-spezifischen DNA-Oligonukleotide P14I, P15III, wurden von Frau Dr. Martina Schnölzer-Rackwitz im Rahmen ihrer Dissertation in der Abteilung Viroidforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie synthetisiert (Schnölzer et al., 1985; Schnölzer-Rackwitz, 1985) und freundlicherweise von ihr zur Verfügung gestellt. Die restlichen DNA-Oligonukleotide, insbesondere die für die Mutagenese-Experimente benötigten DNA-Oligonukleotide wurden freundlicherweise in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie synthetisiert.

Übersicht über die zu PSTV komplementären DNA-Oligonukleotide :

DNA-Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	PSTV-Bindungsort
P14I	d (CGCTCCAGGTTTCC)	97 - 110
P15III	d (GTTTCCACCGGGTAG)	259 - 273
SE1	d (ACCAACTGCGGTTCCAAGGGCTAA)	332 - 355

Übersicht über die mutagenen PSTV-DNA-Oligonukleotide :
Die Stelle der Mutation ist gekennzeichnet

DNA-Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	PSTV-Bindungsort
OF1	d (CGGGCGCGAAGAAGGACAC)	199 - 217
VM2	d (CGCCCCG-AACAAGATTAGATAGAG)	301 - 324
SS1	d (CGGGGATCCCTAAGCTTGGGT)	(83 - 95)*
SS2	d (CGGGGATCCCCAAGCTTGGGT)	(83 - 95)*
SS3	d (CGGGGATCCCCGAGCTTGGGT)	(83 - 95)*
SS4	d (CGGGGATCCGTGAGCTTGGGT)	(83 - 95)*
SS5	d (CGGGGATCCTTAAGCTTGGGT)	(83 - 95)*
SS6	d (CCGGGGATGCCTGAGCTTGGG)	(83 - 95)*
SS7	d (CCGGGGAACCCTGAGCTTGGG)	(83 - 95)*
DD1	d (GAATTCCCGCCTGAAGCGCTC)	(76 - 87)*
DD2	d (GAATTCCCCCGTGAAGCGCTC)	(76 - 88)*
DD3	d (GAATTCCCCCCTAAAGCGCTC)	(76 - 88)*
DD4	d (GAATTCCCCCCTGTAGCGCTC)	(76 - 88)*
DD5	d (GAATTCCCCCCTGATGCGCTC)	(76 - 88)*

*: Das DNA-Oligonukleotid ist nur in einem Teil zu PSTV komplementär, im anderen Teil zu Vektor-Sequenzen.

3.6 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden bei folgenden Herstellern bezogen :
gamma-^{32}P-ATP, sowie alpha-^{32}P-Desoxy-Ribo-Nukleosid-Triphosphate und alpha-^{32}P-Ribo-Nukleosid-Triphosphate : Amersham, Braunschweig;
$^{125}J_2$: NEN, Dreieich;

3.7 Puffer und Phenollösungen

Hier sind Puffer- und Phenollösungen aufgeführt, soweit sie nicht im Methodenteil bei ihren speziellen Anwendungen erwähnt sind :

50 x Denhardt's Lösung :	1 % Ficoll 400
	1 % Polyvinylpyrrolidon
	1 % BSA
20 x SSC Puffer :	3 M NaCl
	0,3 M Natriumcitrat
	mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
20 x SSPE Puffer :	3,6 M NaCl
	200 mM Na_2PO_4 (pH 7,4)
	20 mM EDTA (pH 7,4)
1 M TBE Puffer :	1 M Tris
	830 mM Borsäure
	10 mM EDTA
	Es stellt sich ein pH Wert von 8,3 ein.
TE Puffer (1x) :	10 mM Tris-HCl pH 8,0
	1 mM EDTA pH 8,0
TEMS Puffer :	100 mM Tris
	100 mM NaCl
	75 mM HCl
	10 mM EDTA
	10 mM 2 Mercaptoäthanol
Extraktionsphenol :	1 kg Phenol
	1 g 8-Hydroxychinolin
	250 ml Chloroform
	300 ml TEMS

Diese Mischung löst sich über Nacht. Das Extraktionsphenol wurde zur Extraktion von Blättern, sowie bei der Isolierung von Vektor-DNA verwendet.

Phenollösung : Phenol (250 g) und 8-Hydroxychinolin (0,25 g)
wurden zweimal mit dem gleichen Volumen 1M Tris-HCl pH 8,0 extrahiert dreimmal mit 1x TE Puffer extrahiert und unter 1x TE Puffer in kleinen Portionen aufbewahrt;
Diese Phenollösung wurde zur Phenolisierung kleiner Volumina verwendet.

3.8 Säulenmaterialien

Folgende Säulenmaterialien wurden verwendet :
Biogel A 0.5, 100-200 mesh: BioRad, München;
Sephacryl S 1000 superfine: Pharmacia, Freiburg;
Sephadex G50 superfine: Pharmacia, Freiburg;

3.9 E.coli-Stämme

Es wurden 4 E.coli-Stämme verwendet :
E.coli JM83 (Messing, 1979);
E.coli JM103 (Messing et al., 1981);
E.coli BMH71/18 (siehe Kramer,B. et al., 1984);
E.coli WK6-MutL, dieser Stamm ist ein Abkömmling des Stammes MK30-3 (Kramer,W. et al., 1984) und verfügt über eine Mutation im Mut-L Gen.

3.10 DNA-Vektoren

Plasmid pBR322 (Boliviar et al., 1977);
Plasmid pUC8 (Viera und Messing, 1982);
Plasmide pSP62-PL, pSP64, pSP65 (Melton et al., 1984);
Plasmide pGem1, pGem2, Promega Biotec, Heidelberg;
Bakteriophage M13mp8 (Messing und Viera, 1982);
Bakteriophage M13mp10, M13mp11 (Messing, 1983).
Bakteriophage M13mp18, M13mp19 (Norrander et al., 1983);
Bakteriophage M13mp18amIV, M13mp19amIV (Carter et al., 1985);

3.11 Weitere Materialien

Econo-Säulen, Durchmesser 7 mm, 4 bzw 10 cm lang: BioRad, München;
Filter zur Zellkolonie-Hybridisierung : HATF Filter, Millipore, Eschborn;
Gene Screen Membranen für Northern Blots: NEN, Dreieich;
Röntgenfilme stammten von der Firma Fuji oder Kodak, die Verstärkerfolien von Dupont;
Whatman 3 MM Papier: Kontron, Heidelberg;

3.12 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet :

Zentrifugen :
Eppendorf Zentrifuge 5414;
Sigma 2MK;
Haereus Christ Minifuge-2;
Sorvall superspeed RC2-B, Rotor HS 4;
Haereus Christ Cryofuge 6-4S;
Beckman LB 8-70 Ultrazentrifuge;
Speed-Vac Concentrator: Uni Equip, Savant Instruments Inc, Hicksville;

Szintillationszähler :
Packard Tri Carb 460C Automatic (^{32}P wurde ohne Szintillator gemessen);

Homogenisator :
Ultra-Turrax: Janke & Kunkel, IKA Werk;

Dot-Blot-Apparatur :
Hybri-Dot: Gibco-BRL, Eggenstein;

Mischapparatur für Reagenzgläser und Eppendorfgefäße :
Vortex-Genie: Scientific Industries, Bohemia N.Y., USA;
Paramix: Julabo, Seelbach;

UV-Transilluminatoren:
Cromato-Vue 254, bzw 366 nm: Ultra-Violet Products, San Gabriel CA, USA;

Wärmeinkubationsschrank für Hybridisierungen: Bachofer Reutlingen;

4. METHODEN

4.1 Enzymatische Reaktionen

Im folgenden werden die Bedingungen der einzelen Enzymreaktionen aufgelistet.

4.1.1 DNA-Ligase

Die Ligasereaktion dient zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten und wurde mit T_4-DNA Ligase in folgenden Puffern durchgeführt :

Ligasepuffer (1 x) : 50 mM Tris-HCl pH 7,5
10 mM $MgCl_2$
10 mM DTT
1 mM Spermidin
1 mM ATP
0,1 mg/ml Rinderserumalbumin

Die Ligasereaktion wurde in der Regel in einem Volumen von 10-20 ul bei 12°C für 12 Stunden durchgeführt. Die Hälfte eines Ligaseansatzes wurde jeweils zur Transformation, bzw zur Transfektion verwendet.

4.1.2 Phosphatase

Mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm konnten die Phosphatreste am 5'-Ende von DNA entfernt werden. Dies war erforderlich, wenn ein DNA-Fragment zB mit ^{32}P markiert werden sollte, oder wenn die Religierung einer linearisierten Vektor-DNA unerwünscht war.
Die Phosphatasereaktion wurde in 100 ul folgenden Puffers durchgeführt :

50 mM Tris-HCl pH 9,0
1 mM $MgCl_2$
1 mM Spermidin
0,1 mM $ZnCl_2$

Pro pMol an 5'-Enden wurden 0,1 Einheiten Phosphatase eingesetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Sollten zurückgesetzte oder glatte 5'-Enden dephosphoryliert werden, wurde nach weiterer Zugabe der gleichen Menge Enzyms nochmals 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Durch Zugabe von Nitrilotriessigsäure bis zu einer Konzentration von 20 mM wurde die Reaktion gestoppt. Sofern die DNA-Probe keiner weiteren Enzymreaktion unterworfen werden mußte, welche die Doppelsträngigkeit voraussetzt (zB Restriktionsverdau), wurde für 15 Minuten gekocht, ansonsten für 30 Minuten bei 65°C inkubiert, um die Phosphatase zu inaktivieren. Anschließend wurde die DNA dreimal phenolisiert und gefällt.

4.1.3 ^{32}P-Markierung von DNA-Fragmenten mit T_4-Polynukleotidkinase

Das freie 5'-Ende von DNA-Fragmenten läßt sich durch Einbau von ^{32}P aus gamma-^{32}P-markiertem ATP mit T_4-Polynukleotidkinase radioaktiv markieren. Dies wurde folgendermaßen durchgeführt :

DNA mit einer Anzahl von 1 -10 pMol freien 5'-Enden wurden in insgesamt 20- 50 ul Kinasepuffer mit einem Gehalt von 10 - 150 Mikro-Curie gamma-^{32}P-ATP (spezifische Aktivität 5000 Ci/mMol) und 5 -10 Einheiten Polynukleotidkinase bei 37°C zunächst für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe der gleichen Enzymmenge wurde die Inkubation nochmals für 30 Minuten wiederholt.

Kinasepuffer : 100 mMTris-HCl pH 7,6
20 mM $MgCl_2$
10 mM DTT
0,2 mM Spermidin
0,2 mM EDTA

Zur Beendigung der Reaktion erfolgte der Zusatz von EDTA bis zu einer Konzentration von 20 mM. Die nicht eingebaute Radioaktivität wurde anschließend über eine Biogel-Minisäule abgetrennt (siehe 4.3).

4.1.4 Überführung von überstehenden 5'-Enden in glatte Enden mit Klenow-Enzym

Die Mehrzahl der Restriktionsenzyme hinterläßt kohäsive Enden mit einem überstehenden 5'-Ende. Durch "Auffüllen" der überstehenden Einzelstränge mit Klenow-Enzym können glatte Enden erzeugt werden.

Die entsprechende DNA wurde in 50 ul des unten aufgeführten Puffers aufgenommen. und mit einer Einheit Klenow-Enzym für 10 Minuten bei 16^{o}C inkubiert.

Klenow-Puffer :	50	mM Tris-HCl pH 7.2
	10	mM $MgSO_4$
	0,1	mM DTT
	0,5	mM dNTP
	50	ug/ml Rinderserumalbumin

4.1.5 Überführung von überstehenden 3'-Enden in glatte Enden mit T_4-DNA-Polymerase

Mitunter ist es notwendig, überstehende 3'-Enden doppelsträngiger DNA in glatte Enden zu überführen, um sie zB einer "blunt end ligation" zugänglich zu machen, oder um die kohäsiven Enden einer Restriktionsschnittstelle abzubauen. Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T_4-DNA-Polymerase wird der einzelsträngige Bereich abgebaut. Der Zusatz aller vier Desoxy-Nukleosid-Triphosphate bewirkt, daß das Enzym mit seinem Abbau stoppt, sobald die erste gepaarte Base erreicht ist. Die Reaktion wurde ausgeführt in 100 ul T_4-DNA-Polymerasepuffer :

33 mM Tris-Acetat pH 7,9
66 mM KCl
1 mM $MgCl_2$
0,5 mM DTT
0,1 mg/ml
0,2 uM je dNTP

Es wurde für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

4.1.6 Einzelstrangabbau mit Nuklease S1

Nuklease S1 kann zum Abbau von einzelsträngiger DNA und RNA verwendet werden. Das Enzym eignet sich auch zum Abbau von Bereichen einzelsträngiger DNA. Zum Abbau von Einzelstrangenden wurde in der Regel zum Restriktionsansatz das gleiche Volumen folgenden Puffers mit ca 1-2 Einheiten Nuklease S1 zugegeben und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nuklease S1 Puffer : 50 mM Natriumacetat (50 mM Na^+) pH 4,5
50 mM NaCl
1 mM $ZnCl_2$

Bei den Kontrollverdaus von Proben, die auf ihre Infektiosität hin überprüft werden sollten, wurden die Nukleinsäuren in 500-800 ul Nuklease S1 Puffer gelöst und mit 150 Einheiten für 60 Minuten bei 37°C verdaut. Kontrollbehandlungen und anschließende Analyse durch Gelelektrophorese zeigten, daß doppelsträngige DNA bei dieser Behandlung bis auf geringe Abbauprodukte unbeinflußt bleibt.

4.1.7 Herstellung DNase-freier RNase A, und deren Anwendung

Um sicher zu gehen, daß die verwendete RNase A nicht mit anderen Nukleasen, verunreinigt war, wurde die große Hitzeresistenz der RNase A ausgenutzt und diese in einer Konzentration von 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 15 mM NaCl für 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt und zur Renaturierung langsam abgekühlt.

Bei den Kontrollbehandlungen einiger Proben, die auf ihre Infek-

tiosität getestet wurden, wurden die entsprechenden Nukleinsäuren in ca 500-800 ul 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 gelöst und mit 4 ug DNase-freier RNase A für 30 Minuten bei 37°C verdaut.

4.1.8 **DNase I**

RNase-freie DNase I wurde im Anschluß an die SP6-Transkription zugegeben (siehe unten). Weiterhin wurden einige Proben vor ihrem Biotest zur Kontrolle mit DNase I verdaut. Hierzu wurden die Nukleinsäuren in 500 ul des folgenden Puffers mit 50 Einheiten DNaseI für 60 Minuten bei 37°C behandelt.

DNaseI Puffer :	40	mM Tris-HCl pH 7,5
	6	mM $MgCl_2$
	10	mM DTT
	4	mM Spermidin
	100	Einheiten/ml RNasin

4.1.9 **Transkription mit SP6-RNA-Polymerase**

Mit Hilfe der SP6-RNA-Polymerase kann, ausgehend von einer geeigneten DNA-Matrize, die entsprechende RNA in vitro synthetisiert werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die sogenannte "SP6-Transkription" eingesetzt, um PSTV-RNAs beider Polaritäten zu erhalten. Dabei muß man zwei Reaktionstypen unterscheiden, die analytische und die präparative SP6-Transkription. Bei der analytischen Transkription wurde eine relativ kleine Menge an RNA in Anwesenheit von radioaktiv markierten Nukleotiden synthetisiert. Das Produkt besitzt jedoch eine hohe spezifische Radioaktivität und ist daher hervorragend als spezifische Hybridisierungsprobe geeignet (Herold, 1986). Bei der präparativen SP6-Transkription geht es darum, möglichst große Mengen an RNA-Transkripten zu erhalten.

Analytische SP6-Transkription :

Die analytischen SP6-Transkriptionen wurden in einem Endvolumen von 20 ul durchgeführt, die neben 10 uCi ^{32}P-UTP (410 Ci/mMol) folgende Substanzen enthielten :

	40	mM Tris-HCl pH 7,5
	6	mM $MgCl_2$
	10	mM DTT
	4	mM Spermidin
je	0,5	mM ATP,CTP,GTP
	0,01	mM UTP
	100	Einheiten/ml RNasin
	0,1	ug/ml BSA
	10	ug/ml linearisierte DNA-Matrize

Nach Zugabe von 10 Einheiten SP6-RNA-Polymerase wurde für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 Einheiten RNase-freier DNase wurde nach 2 weiteren Minuten phenolisiert und der Überstand über eine Biogel A 0.5 Säule chromatographiert (siehe 4.3). Damit konnte die in RNA eingebaute Radioakivität von den freien radioaktiv markierten Nukleotiden abgetrennt werden. Aus dem Verhältnis der eingebauten zur insgesamt eingesetzten Radioaktivität ließ sich unter Berücksichtigung der bekannten Ausgangskonzentrationen die Gesamtmenge an synthetisierter RNA berechnen. Bei diesem Reaktionsansatz wurden in der Regel 80-90% der verfügbaren radioaktiv markierten UTP-Moleküle inkorporiert.

Präparative SP6-Transkription :

Bei der präparativen SP6-Transkription wurde das Reaktionsvolumen auf 100 ul erhöht. Weiterhin wurde die UTP-Konzentration derjenigen der anderen Nukleotide angepaßt, also auf 0,5 mM erhöht. Schließlich wurde die DNA-Matrize in einer Konzentration von 20 ug/ml zugegeben und insgesamt 50 Einheiten SP6-RNA-Polymerase eingesetzt. Um die durch Einbau aus der Reaktionsmischung entfernten Nukleosid-Triphosphate zu ersetzen, wurden im Abstand von ca einer Stunde neue Nukleosid-Triphosphate zugegeben, so daß sich die Konzentration um 0,5 mM erhöhte. Nach 3-5 Stunden wurden 12 Einheiten RNase-freier DNase zugegeben und nach 5 weiteren Minuten wurde ebenso phenolisiert und wie im Kapitel 4.3 beschrieben über eine Biogel A 0.5 Säule chromatographiert. Die

Ausbeute an RNA, sowie deren Qualität konnte durch Messung eines UV-Spektrums betimmt werden.

Um in einer präparativen SP6-Reaktion eine RNA mit einer "Cap"-Struktur zu synthetisieren, wurde das "Cap"-Nukleotid G(5')ppp(5')G in einer Endkonzentration von 2,5 mM zum Reaktionsansatz dazugegeben (vergl. Nielsen und Shapiro, 1986). In diesem Falle wurde auf die weitere Zugabe von frischen Nukleosid-Triphosphaten verzichtet.

4.2 Nukleinsäurefällungsmethoden

Die Fällung von Nukleinsäuren dient in erster Linie zur Konzentrierung, sowie zu ihrer Überführung in andere Puffersysteme. Darüberhinaus können auf diese Art und Weise Alkohol-lösliche Substanzen entfernt werden. Insgesamt wurden 2 verschiedene Methoden angewendet : Die Fällung mit Äthanol bzw mit Isopropanol.

4.2.1 Äthanolfällung

Die Äthanolfällung ist für RNA und DNA bis hinab zu Molekülen mit einer Kettenlänge von 8-10 Nukleotiden anwendbar. Dabei wurde folgendermaßen verfahren :

(1) Nach Bestimmung des Volumens wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 oder TE Puffer auf eine Endkonzentration von 0,2 M Na^+ gebracht.

(2) Der wässrigen Phase wurden 2,5 Volumina eiskalten Äthanols zugemischt.

(3) Es folgte eine Kühlphase entweder bei
-20^oC für mindestens 2 Stunden
oder bei -80^oC für mindestens 15 Minuten.

(4) Die Wahl der Zenrifuge richtete sich in erster Linie nach der Größe der zu zentrifugierenden Volumina :

Volumen bis zu 1,5ml : Eppendorfzentrifuge
15 Minuten

50 ml : Minifuge II (Christ)
5000 upm 20 Minuten

250 ml : Sorvall RC2-B mit HS4 Rotor
7000 upm 30 Minuten

1000 ml : Christ Cryofuge 6-4b
4000 upm 30 Minuten

(5) Der Überstand wurde jeweils vorsichtig abgegossen, der Niederschlag mit 70% (v/v) Äthanol gewaschen und nochmals zentrifugiert.

(6) Nach erneutem Dekantieren wurde das Sediment im Vakuum getrocknet.

4.2.2 Isopropanolfällung

Diese Methode ist lediglich zur Fällung von DNAs ab einer bestimmten Größe geeignet. Gegenüber der Äthanolfällung ist das zu zentrifugierende Volumen bei der Isopropalolfällung wesentlich kleiner. Bei dem gesamten Vorgang darf nicht gekühlt werden, um eine Mitfällung der Salze zu verhindern. Deshalb sind keine oder nur kurze Inkubationszeiten nötig, so daß die Isopropanolfällung insgesamt wesentlich schneller durchgeführt werden kann.

DNA-Moleküle mit einer Größe von über 70 bp (Basenpaare) werden nahezu quantitativ gefällt, während DNA-Fragmente, die kleiner als 30 bp sind, ebenso wie Mono-Nukleotide und Nukleosid-Triphosphate nicht gefällt werden. Daher ist diese Fällungsmethode auch zur Abtrennung von kurzen DNA-Fragmenten, zB "Linker"-Molekülen, sowie von Nukleosid-Triphosphaten geeignet. Einzelsträngige M13-DNA läßt sich dagegen ohne Schwierigkeiten mit Isopropanol fällen. Mit dieser Methode ist DNA bis hinab zu Konzentrationen von 100 ng/ml aus Lösungen quantitativ fällbar.

Durchführung der Isopropanolfällung:

(1) Nach Bestimmung des Volumens wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 5 M $NaClO_4$ oder TE Puffer auf eine Endkonzentration von 0,5 M Na^+ gebracht.

(2) Die Menge des zugegebenen Isopropanols, sowie die sich daran anschließenden Inkubationszeiten bei Raumtemperatur richteten sich nach der abgeschätzten DNA-Konzentration und wurde nach den unten angegebenen Bedingungen durchgeführt.

DNA-Konzentration :	0,1-1 ug	1-5 ug	mehr als 5 ug
Zugegebenes Volumen Isopropanol, bezogen auf wässrige Phase :	1 Vol	1 Vol	0,5 Vol
Inkubationszeit :	30 Minuten	0	0

(3) Die Größe des zu zentrifugierenden Volumens bestimmte die Wahl der verwendeten Zentrifuge. Bei Volumina bis zu 1,5 ml wurde in der Sigma 2MK für 15 Minuten bei 14000 upm zentrifugiert.
Bei größeren Volumina wurden unter folgenden Bedingungen zentrifugiert :

bis 50 ml : Minifuge II (Christ)
5000 upm 20 Minuten

bis 250 ml : Sorvall RC2-B mit HS4
Rotor 7000 upm 30 Min

bis 1000 ml : Christ Cryofuge 6-4b
4000 upm 30 Minuten

(4) Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes wurde das Sediment mit einem Volumen 70% (v/v) Äthanol gewaschen.

(5) Nach erneuter Zentrifugation und abermaligem Dekantieren wurde das DNA-Sediment im Vakuum getrocknet.

4.3 Abtrennung von niedermolekularen radioaktiven Molekülen durch Gelfiltration

Radioaktiv markierte (Desoxy-) Ribo-Nukleosid-Triphosphate oder andere radioaktiv markierte Nukleotide, bzw $^{125}J^-$ wurden von höhermolekularem Material durch Gelfiltration abgetrennt. Dazu wurden die entsprechenden Gemische über eine "Mini"säule gegeben. Es wurde eine Pasteurpipette, in deren Verengungsregion silanisierte und autoklavierte Watte eingebracht worden war, mit Biogel A 0.5 bis knapp unter den Rand gefüllt und mit 1x TE Puffer äquilibriert. Solche Säulen besitzen den Vorteil, daß sie infolge der Kapillarwirkung nicht trocken laufen. Zur eigentlichen Säulentrennung wurde dann die Probe auf die Minisäule aufgetragen. Nach dem Einsickern der Probe in das Biogel erfolgte jeweils eine Zugabe von 100 ul Puffer, bis zum erneuten Einsickern. Vor jedem weiteren Pufferauftrag wurde die Minisäule in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, so daß das Eluat auf diese Art fraktioniert werden konnte. Damit läßt sich eine quantitative Abtrennung des nicht eingebauten Materials erreichen. Nach Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen und nach graphischer Darstellung des Elutionsprofils wurden die gewünschten Fraktionen gefällt.

Diese Art von Gelfiltration wurde auch bei nicht-radioaktiven Reaktionen, wie zB bei präparativen SP6-Transkriptionen verwendet, um nicht eingebaute Ribo-Nukleosid-Triphosphate abzutrennen. In diesem Fall wurden einschließlich der Probe 700 ul auf die Säule als "Vorlauf" aufgetragen, gefolgt von weiteren 650 ul Puffer. Das Eluat, das beim letzten Schritt entstand, enthielt den weitaus größten Teil der gewünschte Nukleinsäure aber keine freien, d.h. nicht eingebauten Nukleotide. Die Konzentration der eluierten Nukleinsäure konnte direkt photometrisch im Eluat bestimmt werden. Diese Art der Gelfiltration kann in hohem Maße reproduzierbar durchgeführt werden.

4.4 Markierung von PSTV-RNA mit ^{125}J

Bei der angewandten Jod-Markierung von Nukleinsäuren wird ein Jodatom kovalent in die 5-Stellung des Cytosinringes eingebaut.
Folgende Lösungen wurden verwendet:

(1) "$TlCl"_3$ -Mix :
5 mM $TlCl_3$
200 mM Natriumacetat (200 mM Na^+) pH 4,5

(2) Sulfit-Puffer:
50 mM Na_2SO_3
200 mM Natriumacetat (200 mM Na^+) pH 4,5

Hochreine PSTV-RNA (5 ug) wurde gelöst durch Zugabe von:

20,0 ul	^{125}NaJ-Lösung, (was meist 2 mCi entsprach)
3,0 ul	200 mM Natriumacetat (200 mM Na^+) pH 4,5
3,75 ul	$TlCl_3$-Mix
3,25 ul	Wasser
30,0 ul	

Der Jodinierungsansatz wurde bei 70°C für 20 Minuten inkubiert und anschließend auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 5 ul Sulfit-Puffer und 150 ul Natriumphosphat-puffer (400 mM Phosphat pH 6,8) wurde für weitere 30 Minuten bei 60°C inkubiert und wieder in Eis gekühlt. Vor der Abtrennung von nicht umgesetztem $^{125}J^-$ mittels Gelfiltration über eine Biogel A 0.5 Minisäule wurden 100 ul E.coli-tRNA (1 mg/ml) zugemischt, um die geringe Menge hochradioaktiv markierter Viroid-RNA kompetitiv vor Abbau-Reaktionen zu schützen und sie anschließend fällen zu können.

4.5 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen

Die Fähigkeit von E.coli-Zellen fremde Nukleinsäuren aufzunehmen, hängt von der Durchlässigkeit der Zellhülle ab. In hoher Effizienz findet dieser Vorgang bei Zellen statt, die mit Ca^{2+} Ionen vorbehandelt und dadurch "kompetent" werden.

Es gibt verschiedene Verfahren, um E.coli-Zellen kompetent zu machen. Die aufwendigeren Methoden, wie etwa die Mehr-Ionen-Technik von Hanahan (1983), liefern deutlich erhöhte Transformationsausbeuten. Da jedoch bei den vorliegenden Klonierungsexperimenten die Transformationsausbeute eine untergeordnete Rolle spielte, wurde ein einfaches $CaCl_2$-Verfahren gewählt, das im Prinzip der Methode von Dagert und Ehrlich (1979), zur Herstellung von kompetenten E.coli-Zellen gleicht. E.coli-Zellen wurden nach folgendem Schema kompetent gemacht:

(1) Animpfen von 50 ml Medium mit dem gewünschten E.coli- Stamm;

(2) Hochziehen der Zellen bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,2 unter kräftigem Schütteln;

(3) Abkühlen in Eis für 5 Minuten;

(4) Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten (Minifuge 5000 upm);

(5) Resuspendieren in 25 ml $CaCl_2$ (50mM), mit folgender Inkubation im Eisbad für 30 Minuten;

(6) Erneute Zentrifugation (Minifuge 5000 upm);

(7) Resuspendieren in 2,5 ml $CaCl_2$ (50mM);

(8) Inkubation für 15-24 Stunden im Eisbad;

4.6 Transformation

Als Transformation bezeichnet man den eigentlichen Prozeß der Aufnahme von fremder Nukleinsäure durch eine Zelle. Nur diejenigen Bakterienzellen, die ein Plasmid mit einem Antibiotikum-Resistenz-Gen aufnehmen, werden so in die Lage versetzt, auf einer sogenannten Selektivagarplatte, welche das entsprechende Antibiotikum enthält, zu Kolonien heranzuwachsen. Da alle Zellen einer solchen Kolonie letztendlich von dem einen Bakterium abgeleitet sind, das ursprünglich die Fremd-DNA aufgenommen hat, bilden sie einen Klon.

Die kompetenten E.coli-Zellen wurden nach folgender Vorschrift transformiert:

(1) Mischen von 10 ul Lösung, die den Plasmid-Vektor enthält (Gesamt-DNA-Menge kleiner als 500 ng) mit 100 ul kompetenten Zellen;

(2) Eisbad für 30-40 Minuten;

(3) "Hitzeschock" für 2 Minuten bei 42^{o}C;

(4) Zugabe von 400 ul Medium;

(5) Inkubation bei 37^{o}C für 30-40 Minuten unter mildem Schütteln;

(6) Ausplattieren auf Selektivagarplatten;

Die nach ca 24 Stunden hochgewachsenen Bakterienkolonien werden als "Transformanten" bezeichnet.

4.7 Zellaufschluß und Fixierung auf Nitrocellulosefiltern zur Kolonie-Hybridisierung

Zur möglichst schnellen und gleichzeitigen Untersuchung der rekombinanten Vektoren vieler verschiedener Klone aus einer Transformation wurde eine Kolonie-Hybridisierung durchgeführt. Damit war zB feststellbar, ob die entsprechende Vektor-DNA PSTV-spezifische Sequenzen enthält oder zB in gewünschter Weise mutiert ist. Diese Methode erfordert keine Isolierung der Nukleinsäuren, sondern geht direkt von den Bakterienkolonien selbst aus. Die Durchführung erfolgte nach der von Maniatis et al. (1982) angegebenen Vorschrift. Dabei werden die Bakterienzellen auf einem Nitrocellulosefilter lysiert, wodurch deren Vektor-DNA freigesetzt wird. Diese wird alkalisch denaturiert und an das Filter gebunden. Sie liegt nun in der für die molekulare Hybridisierung geeigneten einzelsträngigen Form vor. Eine dazu komplementäre, radioaktiv markierte Nukleinsäure kann mit der gebundenen DNA über Basenpaarung eine spezifische Bindung eingehen. Diese läßt sich durch Autoradiographie des Filters nachweisen. Damit wird sichtbar, welche Kolonien die gewünschte DNA enthalten.

Durchführung :

E.coli-Kolonien wurden zusammen mit Kontrollklonen auf zwei geeigneten Agarplatten in einem bestimmten geometrischen Muster ausplattiert. Als Kontroll-Klone wurde meist eine Kultur mit dem Vektor ohne Insert verwendet. Das Koloniemuster wurde unter sterilen Bedingungen (sterile Werkbank) durch Auflegen eines Nitrocellulosefilters auf dasselbe übertragen. Die zweite Agarplatte diente als "Reserve" um den entsprechenden Klon nach seiner erfolgreichen Identifizierung auf dem Filter in Kultur nehmen zu können. Das Nitrocellulosefilter, mit einem Abdruck des Koloniemusters nach oben, wurde nun nacheinander auf Whatman 3 MM Papiere gelegt, die mit den nachfolgenden Lösungen getränkt waren. Durch diese Behandlung erfolgte hintereinander die Fixierung der Zellen, ihr alkalischer Aufschluß und schließlich ihre Neutraliserung.

Papier :	(1) 10% (w/v) SDS	3 Minuten
	(2) 0,5M NaOH, 1,5 M NaCl	5 Minuten
	(3) 0,5M Tris/HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl	5 Minuten
	(4) 2 x SSPE	5 Minuten

Nach Behandlung mit diesen Lösungen wurden die Filter, wiederum mit der Kolonieseite nach oben, für 60 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend, zwischen 2 trockene Whatman-Papiere gepresst, für 2 Stunden bei 80^{o}C im Wasserstrahlvakuum "gebacken". Die Filter waren nun zur eigentlichen molekularen Hybridisierung vorbereitet.

4.8 E.coli-Dauerkulturen

Es wurden 2 Arten von Dauerkulturen von verschiedenen E.coli-Zellen hergestellt. Während die DMSO-LB-Kultur die Zellen praktisch jahrelang lebensfähig halten kann, wurde die TM-Kultur lediglich als Stammkultur für etwa 3 Monate benutzt. Das Ansetzen dieser Kulturen wird im folgenden kurz beschrieben :

DMSO-Kultur :

Die Zellen wurden in Vollmedium hochgezogen, und Dimethylsulfoxid bis zu einer Konzentration von 8% (v/v) zugesetzt. Danach wurde die Zellsuspension bei -80^{o}C eingefroren. Die Zellen der so hergestellten Dauerkulturen sollten über mehrere Jahre lebensfähig bleiben.

TM-Kultur :

Die Zellen wurden abzentrifugiert und im ursprünglichen Volumen TM Puffer (10mM Tris/HCl pH 8,0 , 10mM $MgCl_2$) resuspendiert. Die so gewonnenen Kulturen bleiben für mindestens 3 Monate wachstumsfähig und wurden als Stammkulturen verwendet.

4.9 Transfektion und Anzucht von M13-Phagen

Die Transfektion und Anzucht von Bakteriophage M13 erfolgte in der Regel in dem E.coli-Stamm JM103. Bei den Mutageneseexperimenten wurden auch andere E.coli-Stämme verwendet (siehe unten). Die verwendete Transfektionsmethode ähnelt der verwendeten Transformationstechnik. So werden die kompetenten Zellen in gleicher Weise hergestellt. Bis zum Hitzeschock (siehe Abschnitt Transformation) werden die kompetenten Zellen bei der Transfektion in gleicher Weise behandelt. Dann wurden jedoch 100 ul logarithmisch wachsende JM103-Zellen, sowie 25 ul X-gal (2% v/v in Dimethylformamid), 10 ul IPTG (100 mM) und 3 ml Weichagar (42^{o}C) zugegeben und sofort ausplattiert.

Die weitere Anzucht von M13-Phagen, sowie die Isolierung der Einzelstrang-DNA in präparativem und analytischem Maßstab erfolgte nach dem Protokoll von Messing (1983). Die Isolation von doppelsträngiger M13-DNA aus E.coli-Zellen erfolgte nach dem Schema der Plasmid-DNA Aufarbeitung.

4.10 Isolierung von Vektor-DNA

4.10.1 "Mini"-Präparation von Plasmid- oder doppelsträngiger M13-Phagen-DNA

Die Minipräparationen dienten zur analytischen Isolation von Vektor-DNA aus 4 ml Zellkultur. Die auf diese Weise gewonnene Menge reichte für ca 8 Restriktionsanalysen. Das verwendete Verfahren ist eine Modifikation der von Holmes und Quigley (1981) publizierten Vorschrift :

Folgende Lösungen wurden benötigt:
S-1 : 8 % Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0
S-2 : 8 % Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0,
10 % Triton X 100
S-3 : 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0
TM Puffer : (10mM Tris/HCl pH 8.0, 10mM $MgCl_2$)
Die Durchführung erfolgte nach diesem Schema :

(1) Mit Einzelkolonien von Selektivplatten wurden 5 ml Vollmedium, mit dem endsprechenden Antibiotikum versetzt, angeimpft und über Nacht bei 37°C bis in die stationäre Wachstumsphase hochgezogen.

(2) Die Zellen aus 4 ml Suspension wurden in einem 2,2 ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert (2 aufeinanderfolgende 2 minütige Zentrifugationen mit je 2 ml Zellsuspension).

(3) Es erfolgte Resuspension in 750 ul TM Puffer, gefolgt von erneuter Zentrifugation. Anschließend wurde der Überstand vollständig entfernt.

(4) Es wurde in 75 ul S-1, die 2 mg/ml Lysozym enthielten, auf dem Vortex resuspendiert.

(5) Nach 2 Minuten erfolgte die Zugabe von 75 ul S-2. Es wurde kurz gemischt.

(6) Für genau 45 Sekunden wurde im kochenden Wasserbad inkubiert, gefolgt vom Abkühlen im Eisbad.

(7) Nach Zugabe von 750 ul S-3 wurde von Hand geschüttelt.

(8) Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten in der Sigma 2MK.

(9) Der Überstand wurde mit 500 ul Extraktionsphenol versetzt, auf dem Vortex-Mixer stark geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Trennung der Phasen durch 2 minütige Zentrifugation.

(10) Der wässrige Überstand wurde mit ca 500 ul Chloroform/Isoamylalkohol (24/1, v/v) erneut auf dem Vortex-Mixer gemischt und wieder kurz zentrifugiert.

(11) Der neue, DNA-haltige Überstand wurde mit dem gleichem Volumen Isopropanol versetzt und sofort für 10 Minuten in der Sigma 2MK zentrifugiert.

(12) Die erhaltenen DNA-Sedimente wurden mit Äthanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation im Vakuum getrocknet.

(13) Nach Aufnahme in 80 ul 1x TE Puffer war die DNA einsatzbereit für Restriktionsverdaus. Dazu wurden jeweils 10 ul verwendet, zu denen neben dem jeweiligen Reaktionspuffer und Enzym noch 20 ng DNase-freie RNase A zugegeben wurden.

4.10.2 **Präparative Gewinnung von Plasmid- oder doppelsträngiger M13-Phagen-DNA**

Um Vektor-DNA im präparativen Maßstab zu isolieren, wurde abweichend von der in den meisten Laboratorien üblichen Methode ein Verfahren verwendet, bei dem die Reinigung der isolierten Gesamtnukleinsäuren über eine CsCl-Gleichgewichtszentrifugation vermieden werden kann. Statt dessen wurde die Vektor-DNA durch Gelfiltration von den übrigen zellulären Nukleinsäurekomponenten abgetrennt.

Es wurde ein milder und schonender Zellaufschluß verwendet (Friedrich, 1980), der bewirkt, daß die E.coli-Wirts-DNA mit der Zellmembran verbunden bleibt und daher mit den Zellfragmenten abgetrennt werden kann. Allerdings wird dabei in Kauf genommen, daß die in der E.coli-Zelle enthaltene Plasmid-DNA oder doppelsträngige M13-Phagen-DNA nicht quantitativ freigesetzt wird, so daß man geringere Ausbeuten erhält. Diese lagen je nach Bakterienstamm bei ca 0,5 - 1 mg Plasmid pro Liter Kultur, während mit den üblichen CsCl-Reigungsverfahren Ausbeuten von mehr als 2 mg erzielt werden können.

Die geringeren Ausbeuten des Verfahrens konnten durch die Verwendung größerer Kulturansätze, die schnellere Durchführung und die wesentlich geringeren Kosten, in Folge des Fortfalls der teuren,

arbeits- und zeitaufwendigen CsCl-Gleichgewichtszentrifugation, mehr als ausgeglichen werden.

Durchführung der präparativen Gewinnung von Plasmid-DNA

Das Volumen der präparativen E.coli-Kulturen zur Aufreinigung von Plasmid-DNA betrug 0,5 - 20 l. Die folgenden Angaben beziehen sich jedoch auf die Behandlung der Zellen aus einem Liter. Zur Gewinnung von doppelsträngiger M13-Phagen-DNA wurde ab Schritt (5) das gleiche Verfahren verwendet wie für die Aufarbeitung von Plasmiden.

(1) M9-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, wurde mit einer fischen Vorkultur des entsprechenden E.coli-Stammes angeimpft. die Zellen wurden bei 37°C und bei bei kräftiger Belüftung bis zu einer Zelldichte von OD_{600} : 0,6 - 0,8 hochgezogen.

(2) Nach Erreichen dieser Zelldichte wurde zur Plasmidamplifikation Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 200 ug/ml zugegeben.

(3) Die Zellen wurden danach weitere 12-16 Stunden bei 37°C kräftig belüftet.

(4) Dann wurde die Zellsuspension auf 0°C abgekühlt.

(5) Die Zellen wurden in der Christ Cryofuge bei 4000 upm für 20 Minuten sedimentiert.

(6) Das Zellsediment wurde für mindestens 30 Minuten bei -20°C eingefroren.

(7) Die Zellen wurden in soviel 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% (w/v) Saccharose resuspendiert, daß ein Gesamtvolumen von 19 ml erreicht wurde.

(8) Die Zellsuspension wurde nun in ein für den Beckman Rotor 50.2 Ti passendes Zentrifugenröhrchen überführt. Alle weiteren Schritte bis zur Zentrifugation wurden im Eisbad ausgeführt.

(9) Lysozym (5 mg) aus Hühnereiweiß wurde vorsichtig zugemischt und 10 Minuten inkubiert.

(10) Nach Zugabe von 2 ml EDTA 0,25 M pH 8,0 wurde das Zentrifugenröhrchen zweimal invertiert und weitere 15 Minuten bei $0^{o}C$ inkubiert.

(11) Es erfolgte die Zugabe von 2 ml 5 M NaCl und abermaliges zweifaches Invertieren.

(12) Durch Inkubation in einem Wasserbad mit ca $30^{o}C$ wurde die Lösung auf Raumtemperatur gebracht.

(13) Mit einer geeichten Pasteurpipette wurde 1 ml einer 20%igen (w/v) SDS-Lösung durch die Zellsuspension "durchgeblubbert", gefolgt von einem Pipettenvolumen Luft. Anschließend wurde 5 Minuten gewartet.

(14) Zur Abtrennung der durch diese Behandlung entstandenen Zelltrümmer, erfolgte eine Zentrifugation in einem 50.2 Ti-Rotor (Beckman) für 45 Minuten bei 35 000 upm und $10^{o}C$.

(15) Der Überstand, der die gewünschte DNA-Fraktion enthielt, wurde vorsichtig abgegossen und mit 15 ml Wasser versetzt.

(16) Zur Abtrennung der Proteine und zur weiteren Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte 3-4 malige Extraktion der wässrigen Phase mit je 15 ml Phenollösung, gefolgt von einer weiteren Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1,v/v).

(17) Aus dem so gewonnenen weitgehend proteinfreien Extrakt wurde die Plasmid-DNA zusammen mit den noch vorhandenen E.coli-RNAs mit Isopropanol gefällt.

Das so gewonnene Nukleinsäurematerial enthielt monomere Plasmid-DNA und höhere Plasmidformen (Dimere usw), sowie verschiedene Arten niedermolekularer RNAs und geringe Spuren von chromosomaler

E.coli-DNA. Die Nukleinsäuren der Gesamtfraktion wurden in ca 2 ml 50mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 8.0, die ca 5 ug DNase-freie RNAse A enthielten, gelöst und anschließend über eine Sephacryl S 1000 Säule im Molekularsiebverfahren aufgetrennt.

4.10.3 Gelfiltration mit Sephacryl S 1000

Die präparativ gewonnene Vektor-DNA konnte von niedermolekularer RNA, sowie von den Spuren hochmolekularer E.coli-DNA mittels Gelfiltration mit einer Sephacryl S 1000 Säule abgetrennt werden. Diese Säulenchromatographie ist ebenfalls dazu geeignet, um Restriktionsfragmente voneinander zu trennen, sofern sie sich in ihrer Größe um mindestens den Faktor 5-10 unterscheiden.

Es wurde eine Säule mit einem Querschnitt von 5 cm^2 und einer Länge von 90 cm für die Säulenchromatographie verwendet. Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Durchflußvolumen von ca 40 ml/Stunde entgegen der Schwerkraft durchgeführt. Die relativ hohe Ionenstärke des Säulenpuffers diente dazu, unspezifische Wechselwirkungen der Nukleinsäuren mit dem Säulenmaterial zu verhindern (Müller und Kütemeier, 1982).

Säulenpuffer für Sephacryl S 1000 : 50 mM Tris-HCl pH 8,4
20 mM EDTA
500 mM NaCl

Die fraktionierten Nukleinsäuren konnten direkt ohne weitere Salzzugabe mit Isopropanol gefällt werden.

4.11 Trennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

Zur Analyse von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese wurden prinzipiell drei Verfahrensweisen verwendet. Mit Agarosegel-Elektrophorese wurden im allgemeinen DNA-Fragmente mit einer Größe von über 1000 bp analysiert. Sollten kleinere Fragmente oder RNAs aufgetrennt werden, so wurde, sofern nicht anders angegeben, auf 5 % igen Polyacrylamidgelen elektrophoresiert, wobei hier insgesamt drei verschiedene Varianten durchgeführt wurden.

Wenn höchste Auflösung nötig war und die Proben radioaktiv markiert werden konnten, wurde die Trennung auf Sequenzierungsgelen unterschiedlicher Konzentration durchgeführt.

4.11.1 Agarosegel-Elekrophorese

Die Agarose-Elektrophorese dient zur Auftrennung von verschieden langen DNA-Fragmenten, die normalerweise größer als 1000 bp sind.

Durchführung der Agarosegel-Elektrophorese :
Agarose wurde in entsprechender Konzentration (meist 1%) in 1 x Agarosegel-Elektrodenpuffer durch Kochen gelöst und bei 60°C in die gewünschte Flachgelform gegossen. Die Elektrophorese selbst wurde als Horizontalelektrophorese bei 4 V/cm durchgeführt.

Agarosegel-Elektrodenpuffer : 40 mM Tris
5 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
pH 7,8 mit Essigsäure eingestellt

Auftragspuffer : 10 mM Tris-Essigsäure pH 7,8
1 mM EDTA
10 % (w/v) Ficoll 400
0,1 % (w/v) SDS
0,02% (w/v) Bromphenolblau

4.11.2 **Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Die elektrophoretischen Trennungen auf Polyacrylamidgelen können unter nativen und denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. In der Regel wurden 5%ige Polyacrylamidgele verwendet.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einer Größe von ca 30 - 1500 bp wurden native Polyacrylamidgel-Elektrophoresen durchgeführt. Die dazu verwendeten Gele wurden wie folgt hergestellt :

1,35	ml	1 M TBE
10	ml	Acrylamid 30 % (w/v) / Bisacrylamid 0,75 % (w/v)
0,256	ml	Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)
48,4	ml	Wasser
60	ml	

Nach Mischen und Entgasen erfolgte der Start der Polymerisation durch Zugabe von 44 ul TEMED und das Gießen des Geles mit den Maßen 200 x 200 x 1,5 mm.

Als Elektrodenpuffer wurde 22,5 mM TBE verwendet.
Die Zusammensetzung des Auftragspuffer war :

22.5	mM	TBE
1	mM	EDTA
10	%	(w/v) Ficoll 400
0,1	%	(w/v) SDS
0,1	%	(w/v) Bromphenolblau
0,1	%	(w/v) Xylencyanol

Die Elektrophorese wurde mit einer elektrischen Spannung von ca 20 V/cm durchgeführt.

Durch Zugabe von 28,8g Harnstoff zu der Gellösung (was einer Endkonzentration von 8 M Harnstoff entspricht), und einer Erhöhung der Elektrophorese-Temperatur auf 45^{o}C konnten denaturierende Elektro-

phorese-Bedingungen erzielt werden.

Dieses Gelsystem wurde zur Auftrennung von cDNAs, sowie zur Auftrennung von RNAs verwendet. Die Proben müssen vor ihrem Auftrag denaturiert werden und wurden daher in dem gleichen Auftragspuffer wie für Sequenzgele (siehe nächstes Kapitel) aufgenommen und ebenso für 60 Sekunden im kochenden Wasserbad inkubiert und auf Eis abgekühlt.

RNA-Proben, die anschließend auf eine Hybridisierungsmembran übertragen werden sollten, wurden in glyoxalierter Form (siehe 4.15). auf einem 5%igen Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung aufgetrennt :

1,2	ml	500 mM Natriumphosphat pH 6,5 (500 mM Phosphat)
10	ml	Acrylamid 30 % (w/v) / Bisacrylamid 0,75 % (w/v)
0,256	ml	Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)
48,5	ml	Wasser
60	ml	

Der dazugehörige Auftragspuffer hatte folgende Zusammensetzung :

10	mM	Natriumphosphat (10mM Phosphat)
1	mM	EDTA
10	% (w/v)	Ficoll 400
0,1	% (w/v)	SDS
0,1	% (w/v)	Bromphenolblau
0,1	% (w/v)	Xylencyanol

4.11.3 Sequenzierungsgele

Sequenzierungsgele trennen Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen mit hohem Auflösungsvermögen auf. Diese Auflösung läßt sich durch die Wahl des Prozentgehaltes an Acrylamid/ Bisacrylamid und die Laufzeit der Elektrophorese so steuern, daß Längenunterschiede von einem einzigen Nukleotid noch sichtbar sind. Es entsteht dabei das für Sequenzierungsgele typische "Leitern-Muster", allerdings nur dann, wenn eine einheitliche Probe aufgetragen wurde, d.h. DNA-Moleküle, die nur an einem Ende radioaktiv markiert sind. Uneinheitliche Proben führen zu einem "Verschmieren" der Banden. Auf den Sequenzierungsgelen wurden ausschließlich radioaktiv markierte Proben analysiert.

Die verwendeten Sequenzierungsgele hatten entweder die Maße 400 x 200 x 0,2 mm oder es waren Gradienten Gele mit den Maßen 600 x 200 mm, die oben 0,2 und unten 0,6 mm dick waren. Der Dickegradient war logarithmisch gewählt. Während in einem Gel mit gleichmäßiger Dicke die Wanderungsgeschwindigkeit einer Nukleinsäure umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes und damit zu ihrer Kettenlänge ist, sollte die Wanderungsgeschwindigkeit in einem solchen Dicke-Gradientengel umgekehrt proportional zum Molekulargewicht sein. Dies bewirkt den gewünschten Effekt, daß kleinere DNA-Fragmente, die bereits den größten Teil des Sequenzgeles durchlaufen haben, in ihrer Wanderung abgebremst werden. Der Bremseffekt wird um so größer, je weiter die Fragmente wandern und je dicker das Gel wird. Infolgedessen werden die Abstände zwischen den DNA-Fragmenten, die sich in ihrer Kettenlänge um ein Nukleotid unterscheiden, kleiner. Dies gilt insbesondere für den unteren Bereich des Geles. Insgesamt können durch diese Art der "Stauchung" mehr Basen auf einen Sequenzgel "gelesen" werden. Darüberhinaus kommt es durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit auf beiden Seiten eines gegebenen DNA-Fragmentes zu einer Bandenschärfung und damit zu einer klareren Abtrennung verschiedener Fragmente. Auch dieser Effekt führt zu einer besseren Lesbarkeit der Gradientengele.

Alle Sequenzierungsgele wurden analog zu einem von Ansorge und de Maeyer (1980) entwickelten Verfahren hergestellt, bei dem beide Glasplatten vorbehandelt werden. Beide Glasplatten wurden zunächst

über Nacht in 10% Essigsäure aufbewahrt, mit Wasser gespült und getrocknet. Die sogenannte "Öhrchenplatte" wurde silanisiert :

Dazu wurden ca 3 ml einer 5 %igen (v/v) Dichlordimethylsilanlösung in CCl_4 auf der Platte verteilt. Nach Lufttrocknung wurde mit Äthanol nachgewaschen und trockenpoliert.

Die andere Platte wurde ebenfalls silanisiert, aber mit gamma-Methacryloxypropyltrimethylsilan, einer Silanverbindung, die auf Grund des Silylrestes und der reaktiven Doppelbindung über zwei funktionelle Gruppen verfügt und sowohl mit der Glasoberfläche als auch mit Acrylamid reagiert. Somit wurde das Gel letztendlich kovalent an die Glasplatte gebunden.

Die Silanisierung der zweiten Glasplatte geschah folgendermaßen :

Eine Mischung aus : 1 ml Äthanol
30 ul Essigsäure 10 % (v/v)
3 ul Methacryloxypropyltrimethylsilan

wurde auf der Platte verteilt und nach Lufttrocknung mit Äthanol nachgewaschen und trockenpoliert.

Die derart vorbehandelten Glasplatten wurden für 5-, 8- und für 20 % ige Sequenzierungsgele eingesetzt.

Die beiden Geltypen wurden folgerndermaßen hergestellt :

Gele mit gleichmäßiger Dicke :	8 % Gel	20 % Gel
Harnstoff (fest)	16,8 g	25 g
Acrylamid 40 %/Bisacrylamid 2 % (w/v)	8 ml	25 ml
10 x TBE Puffer	2 ml	2,5 ml
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0,4 ml	0,25 ml
Wasser	ad 40 ml	ad 50 ml

Gradientengel :	5 % Gel
Harnstoff (fest)	33,6 g
Acrylamid 40 %/Bisacrylamid 2 % (w/v)	10 ml
10 x TBE Puffer	4 ml
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0,8 ml
Wasser	ad 80 ml

Nach Zusammengeben der Komponenten wurden diese unter Verwendung von Ultraschall gelöst, durch ein Faltenfilter filtriert und die Polymerisation durch Zugabe TEMED (20 ul für das 8 % und 50 ul für das 20 % Gel und 35 ul für das 5% Gradientengel) gestartet.

Anschließend wurde ein Teil der Lösung auf die horizontal liegende mit "Spacern" versehene Glasplatte gegeben und die Öhrchenplatte langsam und vorsichtig, unter Nachgießen der Acrylamidmischung, darüber geschoben, bis beide Platten zur Deckung kamen. Nach Einstecken des Kammes, der zur Aussparung der Auftragstaschen diente, erfolgte die Polymerisation des Geles für 60 Minuten.

Als Elektrodenpuffer für die Sequenzierungsgele wurde 50mM TBE verwendet und als Auftragspuffer :

95	%	(v/v) Formamid
1	mM	EDTA, pH 7,0
0,1	%	(v/v) Bromphenolblau
0,1	%	(v/v) Xylencyanol

Die Elektrophorese mit Sequenzierungsgelen wurde unter möglichst hoher Stromstärke durchgeführt, um durch die auf diese Weise erzeugte hohe Temperatur eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten. Zur gleichmäßigen Wärmeverteilung wurde während der Elektrophorese eine Metallplatte an der Außenseite der Gelplatten befestigt. Es erwies sich als günstig, für die 8% igen Gele, sowie für die 5% igen Gradientengele als limitierende Größe die elektrische Leistung mit 40 bzw 50 Watt zu wählen, was im Endeffekt zu einer Spannung von ca 2000-2500 Volt führte. Im Gegensatz dazu, wurde bei den 20% igen Gelen die apparativ höchstmögliche elektrische Spannung von 3000 Volt angelegt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Öhrchenplatte abgenommen und das kovalent an die andere Glasplatte gebundene Gel für 10 Minuten in 10% iger (v/v) Essigsäure fixiert und für weitere 10 Minuten zur Entfernung des Harnstoffes gewässert. Die 8% Gele, sowie die 5% igen Gradientengele wurden anschließend bei 65^{o}C für ca 1 Stunde getrocknet. Zur Autoradiographie erfolgte die Auflage des Röntgenfilmes und der Verstärkerfolie und das anschließende Exponieren bei -80^{o}C. Die 20% igen Gele wurden nicht getrocknet, sondern nach Abdecken mit Haushaltsfolie direkt autoradiographiert.

4.12 **Nachweis von Nukleinsäure-Banden in Gelen**

Sofern die Nukleinsäure-Proben radioaktiv markiert waren, wurden sie nach elektrophoretischer Auftrennung autoradiographisch nachgewiesen. Andernfalls erfolgte ihr Nachweis in Agarosegelen mit Ethidiumbromid, während Polyacrylamidgele entweder mit Ethidiumbromid oder alternativ mit Silber gefärbt wurden.

4.12.1 Ethidiumbromidfärbung

Agarose- bzw Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese für 15 Minuten in ein wässriges Färbebad mit einer EtBr.-Konzentration von 1mg/l gelegt. Nach kurzem Wässern erfolgte die Betrachtung und gegebenenfalls die Fotographie des Geles im UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm unter Verwendung eines Orange-Filters. In den Fällen, bei denen ein DNA-Fragment aus dem Gel eluiert werden sollte, wurde zur Betrachtung des Geles UV-Licht der Wellenlänge 366 nm verwendet. Das längerwellige Licht vermindert zwar das Signal, ist aber für die DNA schonender, da es weniger Strangbrüche verursacht.

4.12.2 Silberfärbung

Die Silberfärbemethode wurde lediglich für Polyacrylamidgele angewendet. Verglichen mit der Ethidiumbromidfärbung besitzt sie eine deutlich höhere Empfindlichkeit für RNA.

Die Silberfärbung wurde in Anlehnung an die Methode von Goldman und Merril (1982) durchgefürt. Dazu wurde das Gel bei dem Färbevorgang nacheinander verschiedenen Bädern (je ca 500 ml pro Gel) ausgesetzt :

Lösung A : Methanol 50 % (v/v)
Eisessig 12 % (v/v)

B : Methanol 10 % (v/v)
Eisessig 5 % (v/v)

C : $K_2Cr_2O_7$ 3,4 mM
HNO_3 3,2 mM

D : $AgNO_3$ 12 mM

E : $NaCO_3$ 280 mM
Formamid 10 % (v/v)

F : Essigsäure 1 % (v/v)

Färbevorgang :

Lösung	A :	3 Minuten
	B :	mindestens 10 Minuten
	C :	5 Minuten
Wasser		3 x 5 Minuten
Lösung	D :	20 Minuten
Wasser		2 x 5 Minuten
Lösung	E :	bis zur Entwicklung der Banden
		Lösung E mehrmals erneuern
	F :	Schlußfixierung

4.12.3 **Autoradiographie**

Sofern die Proben radioaktiv markiert waren, wurden die Polyacrylamidgele nach Auflegen auf Whatman 3MM Papier getocknet und nach Auflage von Röntgenfilm mit oder ohne Verstärkerfolie bei -80^{o}C autoradiographiert.

4.13 **Restriktionsanalysen**

Eine Restriktionsanalyse umfaßt den "Verdau" einer meist einheitlichen DNA mit Restriktionsendonukleasen und die anschließende Auftrennung der Spaltprodukte auf einem geeigneten Gelsystem. Mit einer solchen Restriktionsanalyse kann überprüft werden, ob die DNA bestimmte Restriktionsschnittstellen besitzt oder nicht, bzw wie sich das Bandenmuster nach Eingriffen auf molekularer Ebene verändert.

Wegen der Vielzahl von möglichen Schnittmöglichkeiten können solche Analysen recht kompliziert werden, insbesondere dann, wenn aus der Kombination der Bandenmuster verschiedener Restriktionsverdaus abgeleitet werden soll, was mit der DNA "geschehen" sein könnte und was nicht.

Da die Sequenzen des PSTV-Isolates KF440-2 und die der meisten DNA-Vektoren bekannt sind, war es möglich, auf der Rechenanlage des Max-Planck-Institutes für Biochemie jeweils die in Betracht kommenden

Rekombinationen zu konstruieren und daraus das Restriktionsmuster für die gewünschten Restriktionsendonukleasen zu berechnen.

Mit Hilfe dieser computerunterstützten Restriktionsanalyse war eine zuverlässige Kontrollmöglichkeit vorhanden, um zu verstehen, was auf der molekularer Ebene eigentlich "passiert" war.

4.13.1 Verdau mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsverdaus erfolgten stets nach Angaben der Enzymhersteller.

4.13.2 Verwendete Gelsysteme zur Auftrennung der Restriktionsfragmente

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte bei Längen von weniger als 500-1000 bp in 5 %igen Polyacrylamidgelen unter nativen Bedingungen, bei längeren Produkten - sofern nicht anders erwähnt - in 1 %igen Agarosegelen.

4.13.3 Eichkurven zur Längenbestimmung

Zur Ermittlung von Eichkurven zur Größenbestimmung wurde der Logarithmus der Kettenlängen bekannter DNA-Fragmente ("Marker") gegen ihre Laufstrecke aufgetragen. Daraus ließ sich die Länge von unbekannten Fragmenten ableiten. Wurde eine möglichst große Genauigkeit gefordert, so wurden bei Polyacrylamidgelen nicht die Fotographien der Gele, sondern die mit Silber gefärbten Gele selbst zur Ausmessung genommen.

4.13.4 Marker für die Gelanalysen

Für die Analyse der Restriktionsmuster bei gelelektrophoretischen Auftrennungen wurden verschiedene Restriktionsverdaus von Plasmid pBR322 verwendet, deren Fragmente als Längenstandards ("Marker") dienten. Die verwendeten Restriktionsenzyme, ihre Erkennungssequenz (ES) und die von ihnen gebildeten Fragmente sind im folgenden aufgeführt, wobei die Längen aller Fragmente in Basenpaaren angegeben sind:

Hae III : Haemophilus aegyptius
ES : GG'CC
glatte Enden, 22 Schnitte, 22 Fragmente
Fragment-Längen:

7	89	267
11	104	434
18	123	458
21	124	504
51	184	540
57	192	587
64	213	
80	234	

Hinf I : Haemophilus influenzae (strain Rf)
ES : G'ANTC N = A,C,G,T
3 Basen kohäsives Ende, 10 Schnitte, 10 Fragmente
Fragment-Längen :

75	298	517
154	344	1631
220	396	
221	506	

4.14 Elution von Nukleinsäuren aus Gelen mittels Isotachophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren auf Gelen ist ein Trennverfahren mit sehr hoher Auflösung. Es eignet sich nicht nur für analytische Zwecke, sondern auch zur Gewinnung kleinerer Mengen an hochreinen Nukleinsäuren definierter Größe. Die Aufreinigung bestimmter DNA-Fragmente ist zB die Voraussetzung für gezielte Klonierung dieser DNAs. Dazu ist es allerdings nötig, das gewünschte Fragment mit hoher Ausbeute und in intakter Form aus dem Gel zu isolieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde zur Elution von Nukleinsäuren aus Gelen eine Vereinfachung der Methode von Öferstedt

et al. (1984) entwickelt und angewendet. Dieses Verfahren beruht auf einer Elektroelution der Nukleinsäure aus dem ausgeschnittenen Gelstreifen. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Elektroelution wird die Nukleinsäure nicht in einen Flüssigkeitsraum eluiert, der zB von einer Dialysemembran eingeschlossenen ist. Es erfolgt vielmehr die Elektroelution in den Flüssigkeitsraum einer Gelfitrationsmatrix, die auf einer Säule eingeschlossen ist. Am unteren und oberen Bereich der Säule werden zwei verschiedene Ionenmilieus eingesetzt, die im Vergleich mit den Nukleinsäuren jeweils schnellere bzw langsamere Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld besitzen. Bei angelegter elektrischer Spannung eluiert die Nukleinsäure aus dem Gelstreifen (siehe auch unten). Aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit kommt es zu einem Konzentrierungseffekt der eluierten Nukleinsäure zwischen den beiden Ionenfronten. Die konzentrierte Nukleinsäurefront wird durch den mit gleicher Geschwindigkeit wandernden Farbstoff Phenolrot sichtbar gemacht. Sobald diese Front aufgrund der angelegten Spannung durch die Säule gewandert ist, läßt man sie in ein Auffanggefäß tropfen. Hierbei kann man sich zusätzlich noch den Gelfiltrationseffekt zu Nutzen machen und die Nukleinsäure von dem niedermolekularen Farbstoff Phenolrot abtrennen. Das Phenolrot ist jedoch aufgrund seiner Alkohol-Löslichkeit auch durch Äthanol- oder Isopropanolfällung entfernbar.

Diese Elektroelution mittels Isotachophorese ist nicht nur eine schnelle und schonende Methode, um Nukleinsäuren von Gelen zu isolieren, sondern sie führt auch zu nahezu quantitativen Ausbeuten, selbst bei höhermolekularen DNA-Fragmenten, etwa M13-Phagen-DNA mit ca 7500 bp oder sogar Lambda-Phagen-DNA-Fragmenten von 20.000 bp (Kütemeier, persönliche Mitteilung). In diesen Fällen ist allerdings eine etwas längere Säule nötig, um die DNA quantitativ zu eluieren.

Die Elektroelution mittels Isotachophorese wurde folgendermaßen durchgeführt :

(1) Eine Econo-Säule von 4 oder 10 cm Länge (Durchmesser 7mm) wurde bis zur Verbreiterung der Säule mit Sephadex G50 gefüllt und mit einer entgasten Lösung von 40 mM Tris-HCl, pH 8,3 äquilibriert.

(2) Die untere Öffnung der Säule wurde mit einer Dialysemembran verschlossen, nachdem der Puffer auf das obere Gelbett eingesunken war.

(3) Das ausgeschnittene Gelfragment, das die zu eluierende Nukleinsäure enthielt, wurde auf die Gelmatrix gelegt.

(4) Das auf dem Säulenmaterial liegende Gelstück wurde mit einer entgasten Lösung von 100 mM epsilon-Amino-Capronsäure vorsichtig überschichtet.

(5) Etwa 1 mg Phenolrot wurden in 10 ml 100 mM epsilon-Amino-Capronsäure gelöst und davon wurden etwa 100 ul ebenfalls auf das Gelstück gegeben.

(6) Das untere Ende der Säule, welches mit einer Dialysemembran verschlossen war, wurde in ein Becherglas getaucht, das ebenfalls mit 40 mM Tris-HCl pH 8,3 gefüllt war.
Es wurde je nach Länge der Säule eine Spannung von 100 V, bzw 200 V angelegt.

(7) Die schnell wandernden Cl^- Ionen aus dem Tris-HCl Puffer entfernen sich von den langsam wandenden Zwitterionen der epsilon-Amino-Capronsäure. Die Cl^- Ionen hinterlassen eine "Ionenlücke". Nukleinsäuren besitzen, ebenso wie das Phenolrot, eine größere Wanderungsgeschwindigkeit als die epsilon-Amino-Capronsäure, aber eine langsamere als Cl^- Ionen. Aus diesem Grunde sammelt sich die eluierte Nukleinsäure, ebenso wie der Farbstoff, zwischen den beiden Inonenfronten. Die frisch aus dem Gelstreifen eluierte Nukleinsäure "überholt" die sie umgebenden epsilon-Amino-Capronsäure und sammelt sich ebenfalls zwischen den Ionenfronten.

(8) Nachdem die Ionengrenzschicht bis an den unteren Rand der Säule gewandert war, wurde die Dialysemembran entfernt und die Nukleinsäure in der Regel zusammen mit dem Phenolrot aufgefangen und gefällt.

4.15 Glyoxalierung von Nukleinsäuren

Glyoxal ist in der Lage, mit der Aminogruppe und dem in der 1 Position stehenden N-Atom des Guanosins eine zyklische Verbindung zu bilden (McMaster und Carmichael, 1977). Dadurch wird die Bildung von G-C Paaren über Wasserstoffbrücken unmöglich gemacht. Das wiederum bewirkt, daß die Nukleinsäuren durch Behandlung mit Glyoxal in Einzelstränge getrennt werden können und damit in voll denaturiertem Zustand vorliegen.

Vorgang der Glyoxalierung :

Die Nukleinsäure wurde in einem definierten Volumen Wasser gelöst. Anschließend erfolgte Zugabe von 2,75 Volumina "DMSO-Mixes" mit darauffolgender Inkubation bei 50°C für 15 Minuten. Nach Abkühlen in Eiswasser und der Zugabe von 1,25 Volumina an Auftragspuffer für Polyacrylamidgele konnte die Probe auf das Gel aufgetragen werden.

"DMSO - Mix" :	25	Teile DMSO
	1	Teil Natriumphosphat (500 mM Phosphat) pH 6,5
	1	Teil SDS 10 % (w/v)
	9,7	Teile Glyoxal

4.16 "Dot Blotting"

Bei dem "Dot Blotting" geht es darum, mit Hilfe einer Art "Tüpfel-Test" und anschließender molekularer Hybridisierung analytisch oder quantitativ nachzuweisen, daß eine bestimmte Nukleinsäure in einer meist rohen Fraktion vorhanden ist. Dazu werden zunächst die zu testenden Nukleinsäuren in einem geometrischen Muster auf eine Hybridisierungsmembran "aufgetüpfelt" und gebunden. Durch anschließende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde wird dann eine dazu komplementäre Nukleinsäure nachgewiesen. Im vorliegenden Falle wurden Nukleinsäureextrakte aus Tomatenpflanzen auf die Anwesenheit von PSTV-RNA bzw PSTV-DNA überprüft.

Die Experimente wurden so durchgeführt:

(1) Der Nukleinsäureextrakt aus 1 g Blattmaterial (siehe Kapitel Sequenzierung von PSTV-RNA) wurde in 500 ul Wasser gelöst.

(2) Je 20 ul dieses Extraktes wurden auf eine Konzentration von 0,5 n NaOH gebracht und 60 Minuten bei 37°C gehalten. Es wurde anschließend Tris-HCl pH 7,5 bis zu einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben, mit HCl neutralisiert und schließlich mit Äthanol gefällt.

(3) Die mit Alkali behandelten Proben wurden in 20 ul Wasser gelöst und ebenso wie weitere 20 ul unbehandelte Probe glyoxaliert.

(4) Es wurde nach der Glyoxalierung je ein Volumen 3 M Lithiumacetat zugegeben.

(5) Die Gene Screen Hybridisierungsmembran wurde passend für die Hybri-Dot-Apparatur zurechtgeschnitten, mit Wasser befeuchtet, kurz in 20 x SSC gelegt und schließlich in die Apparatur eingespannt.

(6) Die glyoxalierten Proben, nunmehr in 1,5 M Lithiumacetat, wurden auf die Gene Screen Membran gegeben und unter Verwendung von Unterdruck langsam durch die Membran gesaugt.

(7) Nach Waschen mit 20 x SSC wurde das Filter luftgetrocknet und im Vakuum bei 80°C "gebacken".

(8) Die eigentliche molekulare Hybridisierung wurde analog zu der im folgenden Abschnitt beschriebenen Methode durchgeführt.

4.17 "Northern Blotting"

Beim "Northern Blotting" werden die RNAs zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf eine Hybridisierungsmembran übertragen und dort schließlich durch Hybridisierung nachgewiesen. Sofern die Übertragung auf die Membran mit Hilfe des elektrischen Stromes erfolgt, bezeichnet mann das Verfahren als "Electroblotting"

4.17.1 Transfer von Nukleinsäuren durch "Electroblotting"

Der Nukleinsäuretransfer auf die Gene Screen Membran im elektrischen Feld wurde entsprechend zu einem Verfahren durchgeführt, das auf den Methoden von Wahl et al. (1979), Stellwag und Dahlberg (1980), Thomas (1980) und Bittner et al. (1980) beruht (siehe auch Meinkoth und Wahl, 1984).

Nach Durchführung einer Polyacrylamidgelelektrophorese mit glyoxalierten RNAs wurde das Gel in ein "Sandwich" verpackt, das aus folgenden Schichten bestand :

Ein "Scotch Brite" Schwamm
Drei Lagen Whatman 3MM Papier
Das Gel
Die Gene Screen Membran
Drei Lagen Whatman 3MM Papier
Ein "Scotch Brite" Schwamm

Abgesehen vom Gel waren alle Materialen zuvor mit dem Transferpuffer (25mM Natriumphosphat, pH6,5) getränkt worden, wobei die Membran zuvor noch mit Wasser angefeuchtet werden mußte.

Es war sorgfältig darauf zu achten, daß zwischen den Schichten keine Luftblasen eingeschlossen waren. Dieser "Sandwich" wurde zwischen zwei Plastikgittern in der mit Transferpuffer gefüllten Elektrodenkammer so eingespannt, daß die Transfermembran anodenseitig zum Gel hin angeordnet war. Der Elektrotransfer wurde im Kältelabor duchgeführt, wobei der Transferpuffer mit Hilfe einer Kühlschlange auf $4^{o}C$ gekühlt wurde. Dabei wurde für zwei Stunden eine Stromstärke von 250 mA und eine weitere Stunde eine Stromstärke von 1000 mA verwendet.

Nach Beendigung des Transfers wurden die Nukleinsäuren durch 4 stündiges "Backen" im Vakuum bei $80^{o}C$ an die Membran fixiert.

4.17.2 Molekulare Hybridisierung

Nachdem die Nukleinsäuren transferiert waren, wurde die Gene Screen Membran in einen 100 ml Plastikmeßzylinder mit den verschiedenen zur Hybridisierung benötigten Lösungen inkubiert. Der Plastikmeßzylinder wurde dabei in waagerechter Position auf einer Rollapparatur befestigt, die ihrerseits in einem Wärmeschrank untergebracht war. Daher war die kontinuierliche Durchmischung der entsprechenden Lösung, sowie die Einhaltung einer gewünschten Temperatur gewährleistet.
Der Hybridisierungsvorgang wurde folgendermaßen durchgeführt :

(1) Zunächst erfolgte die Vorhybridisierung mit ca 3 ml Vorhybridisierungspuffer pro 100 cm^2 Membranfläche für zwei Stunden bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur.

Vorhybridisierungspuffer :
- 5 x SSC
- 0,2 % Polyvinylpyrrolidon
- 0,2 % Ficoll 400
- 0,2 % BSA
- 1 % SDS
- 50 % Formamid (2x umkristllisiert)
- 125 ug/ml tRNA aus E.coli

(2) Es erfolgte die Zugabe des Hybridisierungspuffers der mit dem Vorhybridisierungspuffer identisch ist, jedoch zusätzlich die radioaktiv markierte Probe enthielt. Es wurde für mindestens 16 Stunden bei der Hybridisierungstemperatur inkubiert.

(3) Nach Beendigung des Hybridisierungsvorganges erfolgten zwei Waschungen mit ca 50-100 ml 2 x SSC bei Raumtemperatur für 5 Minuten.

(4) Es folgten zwei Waschungen in 2 x SSC, 0,5 % SDS für je 30 Minuten bei der Hybridisierungstemperatur.

(5) Nach zwei weiteren Waschungen in 0,1 x SSC für je 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Membran getrocknet und exponiert.

Als Hybridisierungsproben wurden entweder radioaktiv markierte M13-Phagen-DNA verwendet, die durch Synthese des zweiten DNA-Stranges an der Einzelstrang-DNA-Matrize gewonnen wurde. Später wurden radioaktiv markierte SP6-RNA-Transkripte verwendet.

PSTV-spezifische Hybridisierungen wurden bei 60°C durchgeführt. Zum spezifischen Nachweis eines PSTV-Stranges von (+) oder (-) Polarität wurde mit DNA-Proben bei 70°C und mit SP6-RNA-Proben bei 75°C hybridisiert.

4.18 **Hybridisierung von RNA in Lösung**

Es sollten für einen Infektionsversuch PSTV (+) und PSTV (-) RNAs in Lösung aneinander hybridisiert werden. Dies geschah folgendermaßen:

(1) Die beiden RNA-Komponenten wurden gemischt und gemeinsam mit Äthanol präzipitiert.

(2) Das Sediment wurde in 30 ul Hybridisierungspuffer (80% (v/v) Formamid, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA) gelöst.

(3) Die RNA-Mischung wurde für 5 Minuten bei 85°C inkubiert.

(4) Anschließend wurde die Lösung bei 50°C inkubiert und im Laufe von 2-3 Stunden auf unter 30°C abgekühlt.

(5) Durch Zugabe von 800 ul Äthanol/0,3 M Natriumacetat im Verhältnis 5:2 (v/v) und Abkühlen auf -80° wurden die RNA-Hybride gefällt.

(6) Die Hybride wurden durch Zentrifugation gesammelt.

4.19 Infektiositätstests mit PSTV-cDNA und PSTV-RNA

Die zu testenden Nukleinsäuren wurden in 1%iger K_2HPO_4 Lösung (w/v) aufgenommen. Zur Inokulation wurden etwa 3 Wochen alte Tomatenpflanzen der Sorte "Rentita" verwendet. In diesem Entwicklungsstadium besitzen die Pflanzen außer den Keimblättern, zwei weitere voll entfaltete Blätter, welche mit Karborund bestäubt wurden. Anschließend wurden schrittweise 100 ul Inokulationslösung, welche die zu testende Nukleinsäure enthielt, auf das bestäubte Blatt pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Glasspatels vorsichtig auf den Blättern "abgerieben". Unmittelbar nach der so erfolgten mechanischen Inokulation wurden die Blätter mit Leitungswasser abgewaschen.

Zur Kontrolle wurden jeweils eine Gruppe von Pflanzen lediglich mit 1%iger K_2HPO_4 Lösung inokuliert.

Zur Entwicklung der Krankheitssymptome einer PSTV-Infektion wurden die Pflanzen im Gewächshaus bei 24 - 28 ^{o}C unter natürlichen Lichtverhältnissen zwischen 30.000 - 50.000 Lux gehalten. Abhängig von der Tageslichtlänge und den Wetterverhältnissen traten meist nach etwa 13-18 Tagen die ersten PSTV-Krankheitssymptome auf, nämlich Formen von Epinastie, Blattverformung, Wachstumshemmung und Stauchung der gesammten Pflanze.

Zur Bonitur eines Versuches wurde die Anzahl der Symtome aufweisenden Pflanzen in regelmäßigen Abständen bestimmt.

4.20 Aufreinigung von DNA-Oligonukleotiden

Die für die Mutagenese Experimente eingesetzten DNA-Oligonukleotide wurden "maschinell" synthetisiert. Bevor sie für molekularbiologische Zwecke einsetzbar waren, mußten allerdings die Basenschutzgruppen, sowie die 5'-endständige Tritylgruppe entfernt werden. Außerdem war es erforderlich, das gewünschte Oligonukleotid von kürzeren Syntheseprodukten abzutrennen.

Dies geschah nach folgender Vorschrift:

(1) Das "maschinell" hergestellte DNA -Oligonukleotid wurde in einem Glasfläschchen und gelöst in 2 ml einer Ammoniaklösung angeliefert.

(2) In dieser Lösung wurde das DNA-Oligonukleotid für mindestens 5 Stunden bei 56^{o}C inkubiert. Dabei wird das Oligonukleotid vom Trägermaterial abgespalten.

(3) Um ein Herausspritzen der Lösung zu vermeiden, ließ man das Eppendorfgefäßes auf Raumtemperatur abkühlen.

(4) Die Flüssigkeit, in der die abgespaltenen DNA-Oligonukleotide enthalten waren, wurde entnommen und in ein verschließbares Glasgefäß überführt.

(5) Die abgenommene Flüssigkeit wurde etwa 5 mal mit Äther extrahiert. falls keine Phasentrennung auftrat, wurde mit Wasser verdünnt. Die Ätherphase (Oberphase) wurde verworfen. Anschließend wurde in der Speed-Vac getrocknet.

(6) Die Probe wurde nochmals in wenig Wasser gelöst und erneut lyophilisiert.

(7) Zur Abspaltung der Tritylschutzgruppe wurde der Proben-Rückstand in 2 ml 80%iger Essigsäure aufgenommen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

(8) Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurde die Oligonukleotid-Lösung 5 mal mit Äther extrahiert, dann in Trockeneis oder flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend lyophilisiert.

(9) Das Lyophilisat wurde in Wasser gelöst. Um Rückstände zu entfernen, welche bei der Gelelektrophorese stören könnten, wurde das DNA-Oligonukleotid mit Äthanol gefällt. Dazu wurde die Lösung wie bei einer gewöhnlichen Äthanolfällung auf 0,3 M Natriumacetat

gebracht, 2,5 Volumina Äthanol zugegeben und bei -80°C gefällt. Das Sediment der Äthanolfällung wurde für die anschließende gelelektrophoretische Reinigung eingesetzt.

(10) Die Reinigung der Oligonukleotide durch Elektrophorese erfolgte auf einem 15% igen Sequenzgel (Acrylamid/Bisacrylamid = 19:1) mit den Maßen 400 x 200 x 1,5 mm.
Die Zusammensetzung des Geles war folgendermaßen:

Harnstoff	50,4 g
40% Acrylamid/ 2% Bisacrylamid	45 ml
1 x TBE	12 ml
10 % Ammoniumpersulfat	1,2 ml
	--------
	ad 120 ml
TEMED	120 ul

Es wurde ein Kamm für 12 Taschen verwendet, von denen allerdings nur maximal 7 für die zu reinigenden DNA-Oligonukleotide genutzt wurden, um gegenseitige Verunreinigungen möglichst zu vermeiden. Die Elektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis der Bromphenolblau Marker etwa 3/4 der Trennstrecke durchlaufen hatte. Die Position der DNA-Oligonukleotide wurde mit Hilfe einer DC-Fluoreszensplatte im langwelligen UV-Licht sichtbar gemacht. Die Bande, die in der jeweiligen Spur am langsamsten wanderte, wurde ausgeschnitten und mittels Isotachophorese eluiert.

(11) In einigen Fällen wurde die Sequenz der DNA-Oligonukleotide mittels der Maxam-Gilbert-Technik bestimmt.

4.21 Mutagenese von PSTV-DNA

Der Klon M13-Ha88 enthält "stromabwärts" des SP6-Promoters das gesamte PSTV-Genom, sowie die sechs zusätzlich duplizierten Nukleotide 83-88 des PSTV. Dieser rekombinante M13-Phage, der von M13mp19amIV abgeleitet ist, wurde auf dem Suppressor-Stamm E.coli JM103 angezogen. Die daraus erhaltene Einzelstrang-DNA wurde zur Mutagenese mit Hilfe der "gapped duplex" Methode unter Verwendung der "Amber-Selektion" eingesetzt.

Zur Selektion der in vitro erzeugten M13-Konstrukte standen zwei Suppressor-negative E.coli-Wirtsstämme zur Verfügung:
Der Mutator-Stamm WK6-MutL und der Non-Mutator-Stamm BMH71/18.

Durchführung der Mutagenese :

(1) Doppelsträngige M13mp19-DNA wurde mit EcoRI und HindIII quantitativ geschnitten. Dabei entstehen zwei DNA-Fragmente, nämlich das kurze ca 50 bp lange Fragment des Polylinkers, sowie die restliche M13-DNA. Diese Fragmente wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

(2) Das große EcoRI-HindIII-Fragment wurde mittels Isotachophorese eluiert.

(3) Das mutagene DNA-Oligonukleotid wurde am 5'-Ende mit Hilfe von T_4-Polynukleotidkinase folgendermaßen phosphoryliert:

Kinase der mutagenen DNA-Oligonukleotide :

4 ul	DNA-Oligonukleotid (1 OD_{260}/ml)
2 ul	10 x Kinasepuffer
2 ul	rATP 1 mM
11 ul	H_2O
1 ul	T_4-Polynukleotidkinase (ca 10 Einheiten)
20 ul	

30	Minuten 37°C
+ 1 ul	Kinase
20	Minuten 37°C
10	Minuten 65°C

(4) Zur Herstellung der "gapped duplex" DNA (gdDNA) wurden ca 0,5 ug des gereinigten großen EcoRI-HindIII-Fragmentes, mit 2,5 ug der einzelsträngigen-DNA des Klones M13-Ha88 und ca 1oo ng des 5'-phosphorylierten mutagenen Primers gemischt. Das Gesamtvolumen betrug 80 ul in GD-Puffer (187,5 mM KCl, 12,5 mM Tris/HCl pH 7,5).

(5) Die Mischung wurde für 3 Minuten bei 100°C gehalten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

(6) Es wurden 80 ul des Polymerase/Ligase-"Anpassungspuffers" (PLA-Puffer) zugegeben.

PLA-Puffer :	47,5 mM Tris/HCl pH 7,5
	30 mM $MgCl_2$
	4 mM DTT
	100 uM rATP
	50 uM dNTP

(7) Es wurden 5 Einheiten T_4-DNA Ligase zugegeben und 5 Einheiten Klenow-Enzym. falls erforderlich wurden die Enzyme in einer 1:1

Mischung aus GD- und PLA-Puffer verdünnt.

(8) Es wurde für 60 Minuten bei 18°C inkubiert.

(9) Es wurden 2 x 40 ul des Reaktionsansatzes entnommen und zur Transfektion von kompetenten WK6-MutL-Zellen verwendet (Ansatz A und B). Desgleichen wurden weitere 4 ul entnommen und mit TE Puffer auf 40 ul gebracht. Von dieser Verdünnung wurden 2 x 4 ul ebenfalls zur Transfektion von WK6-MutL-Zellen verwendet (Ansatz C und D).

Der Rest des Reaktionsansatzes wurde bei -20°C eingefroren, falls weitere Transfektionen gewünscht wurden.

(10) Nach dem Hitzeschock wurden die Ansätze A und C direkt auf BMH71/18-Zellen ausplattiert, während die Ansätze B und D erst nach Zugabe von frischem Medium und 70-minütiger Inkubation bei 37°C unter mildem Schütteln auf BMH71/18-Zellen ausplattiert wurden. Die unterschiedliche Behandlung der M13-Konstrukte nach der Transfektion hat folgende Gründe :

Während der 70 Minuten können sich die durch die $CaCl_2$- Behandlung geschwächten kompetenten Zellen erholen und erlauben den in sie transfektionierten M13-Konstrukten das Durchlaufen eines Replikationszyklus. Durch Segregation entstehen zwei Typen von freigesetzten M13-Phagen. Der eine Typus besteht aus amb^- Phagen und ist zu einem hohen Anteil mutiert, der andere Typus ist der des nicht mutierten amb^+ Phagen. Eigentlich sollte ein solcher amb^+ Phage nicht in der Lage sein, auf einem Suppressor-negativem Wirtsstamm wie WK6-MutL zu wachsen, jedoch kann er durch den gleichzeitig in der Zelle anwesenden amb^- Phagen komplementiert werden. Nach der Freisetzung der M13-Partikel und anschließender Infektion von WK6-MutL-Zellen sind jedoch nur amb^- Phagen zur Replikation befähigt, die wiederum zum großen Teil mutiert sind. Die weitere Selektion erfolgt dann auf der Agarplatte auf dem ebenfalls Suppressor-negativen BMH71/18-Stamm, der allerdings nicht defekt in den Reparaturgenen ist. Die direkte Selektion auf BMH71/18-Zellen, wie sie in den Ansätzen A und C durchgeführt wurde, vermindert das Risiko weiterer unbeabsichtigter Muta-

tionen, die in einem Mutator-Stamm wie WK6-MutL leicht vorkommen können. Allerdings besteht hier die Gefahr, daß der mutagenisierte Phage als Helferphage für den nicht mutierten Phagen fungiert und somit die vollständige genetische Segregation unterbleibt. Damit entstehen inhomogene Plaques, die durch neues Ausplattieren auf BMH71/18 gereinigt werden müssen. Probe-Experimente haben ergeben, daß die Inkubation mit frischen Medium in den Ansätzen B und D für 70 Minuten diesen neuerlichen Ausplattierungschritt ersetzen können. Gleichzeitig reichert er die potentiellen Mutanten an, so daß bevorzugt Plaques der Ansätze B und D auf die gewünschten Mutationen getestet wurden.

(11) Nach Inkubation der Agarplatte für ca 12 Stunden entstanden in der Regel eine genügend große Anzahl von Plaques. Die mit M13-Phagen infizierten E.coli-Zellen wurden aus den Plaques auf mehrere frische Agarplatten übertragen, auf welche, abgesehen von der "Reserveplatte", je ein rundes Nitrocellulosefilter gelegt war. Die Anordnung in einem geometrischen Muster erlaubte die Identifizierung eines bestimmten Klones. Auf die Nitrocelluloseagarplatte wurden als Kontrolle Plaques des M13mp19, sowie des Klones M13-Ha88 ("Wildtyp") "aufgepickt".

(12) Nach dem erneuten Anwachsen der infizierten E.coli-Zellen wurde die Nitrocellulose abgenommen und die darauf gewachsenen Zellkolonien aufgeschlossen und fixiert, wie im Abschnitt 4.7. beschrieben.

(13) Die Vorhybridisierung der Filter erfolgte in 6 x SSC, 10 x Denhardt Lösung, 0,2% SDS für 5 Minuten bei 67°C.

(14) Die anschließende Hybridisierung wurde mit dem mutagenen DNA-Oligonukleotid durchgeführt, das am 5'-Ende mit ^{32}P markiert war. Sie erfolgte in 3 ml 6xSSC bei Raumtemperatur für eine Stunde unter gelegentlichem Schütteln.

(15) Unter diesen wenig stringenten Bedingungen hybridisierte das markierte Oligonukleotid mit nahezu jeder Zellkolonie, was durch

kurzzeitige "feuchte" Autoradiographie des Filters nach Abdeckung mit Haushaltsfolie überprüft wurde (Abb. 2).

(16) Der theoretische Tm-Wert des mutagenen DNA-Oligonukleotides wurde nach der Regel von Wallace et al. (1981), bzw Norrander et al. (1983) abgeschätzt :

$$Tm \text{ in } 6xSSC = (4 \times G/C) + (2 \times A/T)\ ^{o}C$$

Demnach trägt jedes G- oder C- Nukleotid $4^{o}C$ und jedes A- oder T-Nukleotid $2^{o}C$ zum Tm-Wert bei.

(17) Die hybridisierten Nitrocellulosefilter wurden zunächst $5^{o}C$ unterhalb des Tm-Wertes für eine Minute in 6xSSC gewaschen. Auf dem Autoradiogramm sollte nunmehr keine unspezifischen Hybridisierungssignale mehr beobachtet werden. Lediglich die Klone mit Inserts, zu denen der mutagene Primer ja homolog ist, sollten Signale geben, gleichgültig ob sie mutiert sind oder nicht.

(18) Durch schrittweise Erhöhung der Waschtemperatur ließ sich zwischen einer M13-Mutante und einem "Wildtyp" unterscheiden, da das mutagene DNA-Oligonukleotid lediglich zu der von ihm induzierten Mutante voll komplementär ist (Abb. 2).

(19) Die potentiellen Mutanten-Klone wurden angezogen und die M13-Einzelstrang-DNA isoliert.

(20) Die endgültige Bestätigung der korrekten Durchführung der Mutagenese erfolgte durch Sequenzierung nach der Methode von Sanger et al. (1977).

Abbildung 2: Beispiel von Zellkoloniehybridisierung zum Test auf zielgerichtete Mutationen.

Nach der Durchführung der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese wurden aus einzelnen Plaques die E.coli-Zellen, welche somit M13-Phagen enthielten, auf einer Agarplatte angezogen, die mit einer Nitrocellulosemembran bedeckt war. Nach der Fixierung der Zellen und Zellaufschluß erfolgte die Hybridisierung mit dem ^{32}P-markierten mutagenen Oligonukleotid unter wenig stringenten Bedingungen. Der linke Teil der Abbildung zeigt ein Autoradiogramm nach einer solchen Hybridisierung. Dabei handelt es sich um den Test auf zwei verschiedene Mutanten (obere bzw untere Hälfte). Alle Zellkolonien zeigen ein deutliches Hybridisierungssignal, auch die Reihen mit Kolonien, welche zur Kontrolle den nicht mutierten M13-Phagen beinhalten (siehe Pfeile). Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Verhältnisse nach mehreren Waschvorgängen bei erhöhter Temperatur. Das Signal der Kontrollen verschwindet entweder ganz (oben) oder wird zumindest deutlich reduziert (unten), während bei den übrigen Kolonien einige starke Signale zurückbleiben. Bei diesen mit Dreiecken gekennzeichneten Kolonien handelt es sich um E.coli-Zellen, welche die in gewünschter Weise mutierten M13-Phagen enthalten. Diese Mutanten besitzen volle Komplementarität zu dem mutagenen Oligonukleotid und liefern daher ein stabiles Hybridisierungssignal.

4.22 DNA-Sequenzierung nach der Maxam-Gilbert-Methode

Die von Maxam und Gilbert (1980) beschriebene Methode der Sequenzierung von DNA beruht auf limitierter und basenspezifischer chemischer Spaltung der an einem Ende radioaktiv markierten DNA. Die Reaktionsprodukte werden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Aus dem autoradiographisch sichtbar gemachten Bandenmuster läßt sich die Basensequenz der so behandelten DNA ablesen.

Diese Sequenzierungsmethode kann sowohl für doppelsträngige, wie auch für einzelsträngige DNAs verwendet werden, vorausgesetzt sie sind jeweils an nur einem Ende markiert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zB einzelsträngige PSTV-cDNA nach Maxam und Gilbert sequenziert. Da diese cDNA ausgehend von einem endmarkierten DNA-Primer durch reverse-Transkription von PSTV-RNA erhalten wurde, war sie direkt für die Sequenzierungsreaktion geeignet.

Die zu sequenzierenden doppelsträngigen DNA-Fragmente wurden an beiden 5'-Enden mit ^{32}P markiert, um danach mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten zu werden, so daß jeweils zwei an nur einem Ende markierte Fragmente entstanden. Diese wurden über Gelelektrophorese gereinigt und für die eigentliche Sequenzierung verwendet.

Die Sequenzierungsreaktionen selbst erfolgten exakt nach den von Maxam und Gilbert in der oben aufgeführten Arbeit angegebenen "procedures" 10-13 mit folgenden Reaktionszeiten:

procedure 10 : Spaltung an G	:	5 Minuten
procedure 11 : Spaltung an G+A	:	90 Minuten
procedure 12 : Spaltung an C+T	:	7 Minuten
procedure 13 : Spaltung an C	:	7 minuten

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend auf einem geeigneten Sequenzierungsgel aufgetrennt.

4.23 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode

Zur Sequenzierung von einzelsträngiger M13-DNA wurde die Didesoxymethode nach Sanger (1977) abgewendet. Hierbei wird, ausgehend von einem spezifischen DNA-Primer, der M13-DNA-Einzelstrang enzymatisch zu Doppelstrang ergänzt. Durch Zugabe von Didesoxynukleotiden in den Reaktionsansatz werden basenspezifischen Abbruchreaktionen erzielt. Die Produkte werden auf einem Sequenzierungsgel analysiert.
Die Didesoxysequenzierung wurde folgendermaßen durchgefürt:

(1) M13-Einzelstrang-DNA, entsprechend zu 200 ul M13 Lysat, wurde in 8 ul Wasser gelöst mit 1 ul 10 x Sequenzierpuffer sowie 1 ul DNA-Primer (0,05 OD/ml, entweder Universal-Sequenzierungsprimer, oder die PSTV-spezifischen Primer P14I, P15III) gemischt.

10 x Sequenzierungspuffer : 500 mM NaCl
100 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM $MgCl_2$
10 mM DTT

(2) Anschließend wurde auf 100°C erhitzt und innerhalb von ca 60 Minuten langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

(3) Anschließend wurden 3 ul alpha-^{32}P-Desoxy-Adenosintriphosphat (3000 Ci/mMol) zugegeben.

(4) Je 3 ul der Mischung wurden zu 2 ul der entsprechenden Nukleotid-Mixe zugegeben, die gelöst in 1 x Sequenzierungspuffer folgende Zusammensetzung hatten :

A-Mix : ddATP : 170 uM; dATP : 0 uM; dCTP, dGTP, dTTP : je 75 uM
C-Mix : ddCTP : 500 uM; dCTP : 4 uM; dATP, dGTP, dTTP : je 75 uM
G-Mix : ddGTP : 500 uM; dGTP : 2 uM; dATP, dCTP, dTTP : je 75 uM
T-Mix : ddTTP : 500 uM; dTTP : 2,5uM; dATP, dCTP, dGTP : je 75 uM

(5) Nach Zugabe von 5 Einheiten Klenow-Enzym (1 ul) wurde die Reaktion für 15 Minuten bei Raumtemperatur vollzogen.

(6) Es wurde 1 ul einer Lösung aus allen vier dNTPs (250 uM) in 1 x Seqenzierungspuffer zugegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

(7) Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ul Auftragspuffer für Sequenzierungsgele gestoppt und 1 ul davon auf ein geeignetes Sequenzierungsgel aufgetragen.

4.24 **Markierung von M13-DNA als Hybridisierungsprobe**

Ausgehend von der M13-Einzelstrang-DNA kann mit Hilfe eines DNA-Primers der komplementäre DNA-Strang synthetisiert werden. Bei Verwendung von radioaktiv markierten Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten läßt sich somit ein entsprechend markierter M13-DNA (-) Strang in vitro synthetisieren, der als strangspezifische Hybridisierungsprobe einsetzbar ist.
Die Markierung wurde folgendermaßen durchgeführt :

(1) Etwa 1-2 ug von einzelsträngiger M13-DNA wurden mit ca 7 ng Universal-Sequenzierungsprimer gemischt und in 10 ul 2 x Sequenzierungspuffer (siehe oben) für 3 Minuten bei 100^{o}C gehalten und innerhalb von einer Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt.

(2) Schließlich wurde das Reaktionsvolumen auf 20 ul erhöht, was durch die Zugabe von alpha ^{32}P-Desoxy-Adenosintriphosphat, sowie den Nukleotiden dCTP, dGTP, dTTP zu einer Endkonzentration von 400 uM, sowie 5 Einheiten Klenow-Enzym erreicht wurde.

(3) Es wurde für zwei Stunden bei 15^{o}C inkubiert und die synthetisierte M13 (-) DNA über eine Biogelsäule gereinigt.

4.25 Sequenzierung von PSTV-RNA aus Einzelpflanzen

Es wurde eine Methode entwickelt, welche es ermöglichte, PSTV-RNA zu sequenzieren, die aus einer einzigen Tomatenpflanze gewonnen wurde. Dazu mußte erstens die Viroid-RNA so angereichert werden, daß eine Primer-spezifische reverse-Transkription möglich war. Zum zweiten mußten die DNA-Primer zum Teil aus Restriktionsfragmenten hergestellt werden und schließlich mußte drittens die cDNA in ihrer Größe fraktioniert werden.

4.25.1 Gewinnung eines Nukleinsäure Gesamt-Extraktes aus Tomatenblättern

Die Nukleinsäuren aus gesunden und viroid-infizierten Blättern von Tomatenpflanzen wurden nach folgender Methode gewonnen :

(1) Ein bis zwei Gramm möglichst junger Blätter wurden geerntet.

(2) Das Blattmaterial wurde nach Entfernen der Stiele in einem 50 ml Falcon-Röhrchen in Gegenwart von 15 ml Extraktionsphenol und 15 ml TEMS Puffer für mindestens 45 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

(3) Es erfolgte Zentrifugation in der Minifuge für 30 Minuten.

(4) Der Überstand wurde abgenommen und erneut mit 15 ml Extraktionsphenol durch "vortexen" extrahiert.

(5) Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation in der Minifuge für 10 Minuten.

(6) Wiederholung der letzten beiden Schritte.

(7) Der Überstand der dritten Phenolextraktion wurde mit 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol= 24/1 (v/v) extrahiert durch "vortexen".

(8) Es erfolgte eine erneute Zentrifugation in der Minifuge für 5 Minuten.

(9) Der wässrige Nukleinsäure-haltige Überstand wurde mit 3M Natriumacetat auf eine Endkonzentration von 0,2 M Na^+ gebracht und anschließend wurden 2,5 Volumina Äthanol zugegeben.

(10) Nach Inkubation bei -20°C erfolgte Zentrifugation in der Minifuge für 30 Minuten.

(11) Nach Waschen des Alkohol-Sedimentes mit 70% (v/v) Äthanol/Wasser wurde erneut durch 10 minütige Zentrifugation in der Minifuge sedimentiert.

4.25.2 Gewinnung einer für die reverse-Transkription geeigneten PSTV-RNA-Fraktion aus Gesamt-Nukleinsäureextrakt

Aus dem rohen Gesamt-Nukleinsäureextrakt wurde die PSTV-RNA nach der folgenden Methode aufgereinigt :

(1) Die getrockneten Alkohol-Sedimente wurden in möglichst wenig Wasser gelöst und in ein Eppendorfgefäß transferiert.

(2) Es erfolgte erneute Äthanolfällung, und Zentrifugation mit anschließendem Waschen und Trocknen der dabei erhaltenen Sedimente.

(3) Die Sedimente wurden dann insgesamt für eine Stunde mit 1 ml 2 M LiCl unter Schütteln (Paramix) im Kältelabor extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation in der Eppendorf Zentrifuge wurde der Überstand abgenommen.

(4) Die LiCl-Extraktion wurde noch zweimal wiederholt.

(5) Die vereinigten LiCl-Überstände (= 1.LiCl-lösliche Fraktion) wurden durch Zugabe von 2,5 Volumina Äthanol gefällt.

(6) Zu den Sedimenten wurden 300 ul 2 M LiCl zugegeben und über Nacht im Kühlschrank belassen.

(7) Es wurde erneut zentrifugiert (Sigma 2MK, 15 Minuten) und der Überstand (= 2.LiCl-lösliche Fraktion) wurde mit 2,5 Volumina Äthanol gefällt.

(8) Die 2. LiCl-lösliche Fraktion wurde in möglichst wenig Wasser aufgenommen, zusammen mit dem doppelten Volumen an Auftragspuffer für Sequenzgele gemischt und für 90 Sekunden in ein kochendes Wasserbad gestellt und in Eis abgekühlt.

(9) Die so behandelte Probe wurde auf einem 5% TBE/Harnstoff Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Lauf erfolgte meist über Nacht bei 45^{o}C und ca 8 V/cm. Parallel wurde eine gereinigte Viroid-RNA als Marker aufgetragen (ca 0,5 ug).

(10) Nach Ethidiumbromidfärbung ließ sich die Position der zirkulären Viroid-RNA anhand der Marker-RNA feststellen. Der entsprechende Bereich der Gelspur der LiCl-löslichen Fraktion wurde aus dem Polyacrylamidgel herausgeschnitten und mittels Isotachophorese eluiert. Die in der so gewonnenen RNA-Präparation enthaltene zirkuläre Viroid-RNA ließ sich mit hoher Effizienz revers transkribieren.

4.25.3 Herstellung von endmarkierten DNA-Primern aus klonierter PSTV-DNA zur Synthese von Viroid-cDNA

Endmarkierte cDNA, die durch Primer-Verlängerung an einer Viroid-RNA-Matrize gewonnen wurde, eignet sich zur Sequenzierung mit Hilfe der Sequenzierungstechnik nach Maxam und Gilbert (1980). Um eine zirkuläre Viroid-RNA vollständig sequenzieren zu können, reicht eine einzige endmarkierte cDNAs nicht aus. Der Bereich des Viroidmoleküls nämlich, der komplementär zu dem verwendeten DNA-Primer ist und daher von ihm "zugedeckt" ist, wird nicht revers transkribiert und ist damit nicht erfaßbar. Abgesehen von den Schwierigkeiten eine cDNA von 359 Nukleotiden in einem Zuge zu sequenzieren, sind daher aus prinzipiel-

len Gründen mindestens zwei verschiedene endmarkierte cDNAs nötig, die im Idealfalle möglichst entgegengesetzte und sich überlappende Bereiche des zirkulären Viroid-Moleküls abdecken. Die verwendeten DNA-Primer sollten möglichst eine Länge von 40-50 Nukleotiden besitzen, um mit hoher Effizienz an die Viroid-RNA binden zu können. Wegen ihrer ausgeprägten Sekundärstruktur eignet jedoch sich nicht jedes beliebige synthetische DNA-Oligonukleotide in gleicher Weise als Primer für die reverse-Transkription.

Während zB das DNA-Oligonukleotid P15III sehr gut die spezifische reverse-Transkription initiieren kann, arbeiten die DNA-Oligonukleotide P14I, sowie SE1 nur sehr schlecht (vergl. Tabler, 1983).

Im Falle des PSTV erweisen sich zusätzlich zu dem DNA-Oligonukleotid P15III einige Restriktionsfragmente als effiziente Primer:

Die Position der radioaktiven Markierung ist mit * gekennzeichnet:

Restriktionsfragment	Bindungstelle des DNA-Primers an der PSTV-RNA	Länge
(a) HaeIII*- BstNI	146*-105	42 Basen
(b) AvaI*- HhaI	288*-242	47 Basen

Für die Sequenzierung von PSTV-RNA genügten in der Regel die beiden ersten Fragmente, wobei mit Fragment (a) der Bereich zwischen Nukleotiden 104-1/359-242 und mit Fragment (b) der Bereich zwischen 241-105 sequenziert wurde.

Die DNA-Primer wurden nach folgendem Verfahren gewonnen :

(1) Jeweils 100 ug des Plasmides pSP-Av6.2(+) wurden quantiativ mit HaeIII bzw AvaI verdaut und anschließend mit Phosphatase behandelt.

(2) Die so behandelte DNA wurde in Portionen von 5 ug über ein natives 5% Polyacrylamidgel getrennt.

(3) Die PSTV-spezifischen dephosphorylierten Restriktionsfragmente

(359 bp HaeIII, 192 bp AvaI, 167 bp AvaI) wurden aus dem Gel mittels Isotachophorese eluiert.

(4) 1 ug der AvaI-Fragmente und 2 ug des HaeIII-Fragments wurden mit 200 uCi ^{32}P-markiertem gamma-ATP und T_4-Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert, was in einem Reaktionsvolumen von etwa 40 ul erfolgte.

(5) Nach Hitzeinaktivierung der Polynukleotidkinase für 15 Minuten bei 65°C, wurde der Puffer an die sich anschließenden Restriktionsverdaus angepaßt und auf ein Endvolumen von 200 ul gebracht.

(6) Es erfolgen folgende Restriktionsverdaus :
359 bp HaeIII-Fragment mit BstNI
192 bp AvaI-Fragment mit HhaI

(7) Es erfolgte Phenolisierung mit anschließender Chloroform-Extraktion und Äthanolfällung.

(8) Die endmarkierten DNA-Fragmente wurden auf einem nativen 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und die als Primer geeigneten Fragmente mittels Isotachophorese aus dem Gel eluiert.

4.25.4 **Gewinnung von endmarkierter PSTV-cDNA**

Nachdem endmarkierte Primer in Form des Oligonukleotides P15III bzw in Form von Restriktionsfragmenten zur Verfügung standen, wurde die reverse-Transkription zur Herstellung von cDNA durchgeführt :

(1) Ein Viertel der Viroid-angereicherten RNA-Präparation (dies entspricht ca 250-500mg Blattmaterial) wurde mit einem geeigneten, radioaktiv markiertem Viroid-spezifischen DNA-Fragment gemischt und gemeinsam mit Äthanol präzipitiert.

(2) Das Sediment wurde in 30 ul Hybridisierungspuffer (80% (v/v) Formamid, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA) gelöst.

(3) Es erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 85°C.

(4) Anschließend wurde die Lösung bei 50°C inkubiert und im Laufe von 2-3 Stunden auf unter 30°C abgekühlt.

(5) Zur Fällung der Oligonukleotid-DNA/Viroid-RNA-Hybride wurden 800 ul Äthanol/0,3 M Natriumacetat im Verhältnis 5:2 (v/v) zugegeben. Nachdem die Probe für 30 Minuten bei -80°C aufbewahrt worden war, erfolgte die Zentrifugation der Hybride.

(6) Nach dem Waschen der Sedimente mit 70% (v/v) Äthanol/Wasser wurde die reverse-Transkription in einem Reaktionsvolumen von 20 ul bei 37°C für 2 Stunden durchgeführt. Die Reaktionsmischung hatte folgende Zusammensetzung: 100mM Tris-HCl pH 8,3, 6mM $MgCl_2$, 15mM KCl, 2mM $Na_4P_2O_7$, 10mM Dithithreitol, je 800 uM ATP, CTP, GTP, UTP, 100 ng/ml ActinomycinD und ca 20 Einheiten AMV-reverse-Transkriptase. Alternativ konnte ebenso M-MLV-reverse-Transkriptase mit den Reaktionsbedingungen des Herstellers verwendet werden.

(7) Durch Hitzeinaktiviverung für 15 Minuten bei 65°C wurde die Reaktion gestoppt.

(8) Nach Zugabe von 20ng DNase-freier RNase A wurde die Probe nach weiteren 15 Minuten bei 37°C direkt auf ein 5% TBE/Harnstoff Polyacryamidgel aufgetragen.

(9) Endmarkierte cDNA-Produkte mit einer Länge von 300 Basen und länger wurden mittels Isotachophorese eluiert. Diese Proben konnten direkt für die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1980) eingesetzt werden.

5. ERGEBNISSE

5.1 Konstruktion von PSTV-DNA-Klonen

Im Verlauf der vorliegenden Dissertation wurde eine Vielzahl von PSTV-DNA-Klonen konstruiert. Letztendlich leiten sich die PSTV-Sequenzen in allen diesen Konstrukten von einem einzigen Klon, dem Plasmid pMT40 ab. Dieses Plasmid war von mir bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit konstruiert worden (Tabler, 1983). Es enthält, wie durch Sequenzanalyse bestätigt wurde, das komplette Genom des PSTV-Isolates KF440-2 mit seinen 359 Nukleotiden (Schnölzer et al. 1985). Die Sequenz dieses PSTV-Stammes und eine Restriktionskarte mit den wichtigsten Erkennungssequenzen ist in Abb. 3 dargestellt.

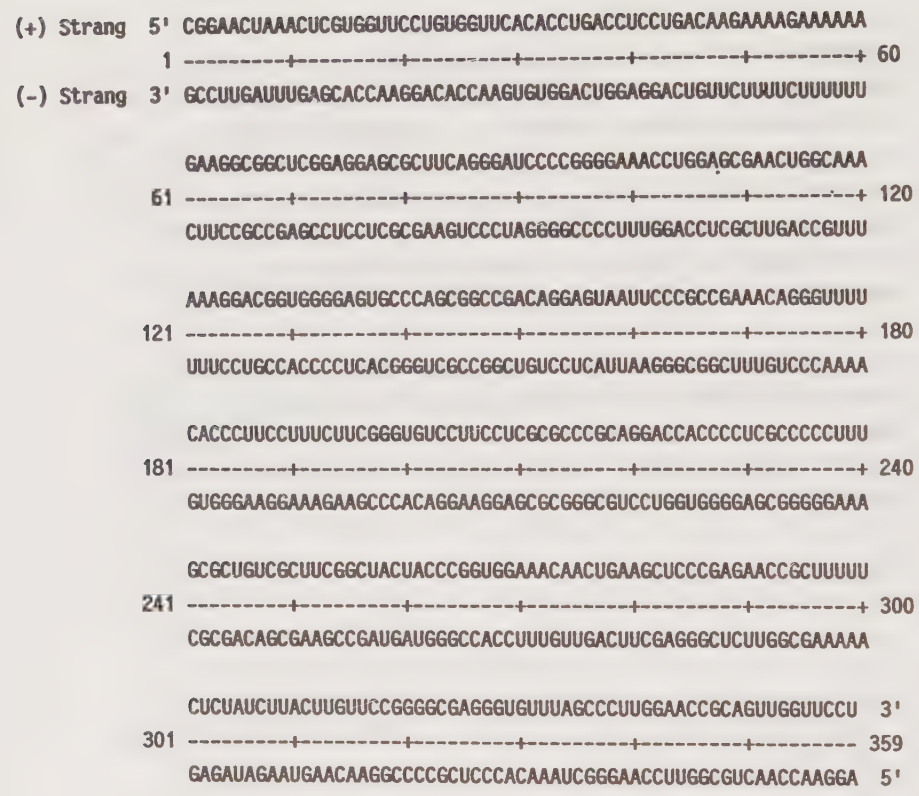
Angesichts der zahlreichen Rekombinationen, die mit der klonierten PSTV-DNA des Klones pMT40 unter Verwendung von gentechnologischen Methoden durchgeführt wurden (siehe das Fließdiagramm in Abb. 4), ist es hilfreich, die grundsätzlichen Unterschiede zwischen einer natürlichen zirkulären, einzelsträngigen Viroid-RNA und ihrem klonierten DNA-Äquivalent zu betrachten. Es sind mindestens vier fundamentale Unterschiede aufzuzählen, in denen sich das klonierte PSTV-DNA-Molekül von der PSTV-RNA unterscheidet:

1. Die klonierte Form besteht aus DNA statt aus RNA.
2. Die klonierte Form ist doppelsträngig statt einzelsträngig.
3. Die klonierte Form ist mit Fremdsequenzen verknüpft.
4. Die klonierte Form ist eine artifiziell lineare Form im Gegensatz zu der normalerweise zirkulären Viroid-RNA.

Insbesondere der vierte Punkt ist von großer Bedeutung. Bei jeder Art der Klonierung muß zwangsläufig die Sequenz des zirkulären Viroid-Genomes irgendwo "aufgeschnitten" und damit künstlich getrennt werden. So sind zB im Plasmid pMT40 die an sich unmittelbar benachbarten

Nukleotide 87/88 getrennt, vergleichbar mit einem linearisierten PSTV-Molekül, das zwischen diesen beiden Nukleotiden gespalten wurde. Konsequenterweise bildet nunmehr das Nukleotid 88 das 5'- und Nukleotid 87 das 3'-Ende (vergl. Abb. 5). Da das PSTV-Molekül 359 Nukleotide enthält, ist es theoretisch möglich, 359 verschiedene lineare Moleküle zu erhalten und daher prinzipiell auch 359 verschiedene DNA-Klone, die jeweils ein komplettes PSTV-Genom enthalten, aber dennoch alle voneinander verschieden sind.

Die Rekombinationen und Subklonierungen oder sonstige Manipulationen der PSTV-DNA, die im folgenden beschrieben werden, haben unter anderem die Funktion, die klonierte DNA in eine andere "quasilineare" Form zu überführen oder sie soweit wie möglich der natürlichen PSTV-RNA anzugleichen.


(+) Strang 5' CGGAACUAAACUCGUGGUUCCUGUGGUUCACACCUGACCUCCUGACAAGAAAAGAAAAAA
1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
(-) Strang 3' GCCUUGAUUUGAGCACCAAGGACACCAAGUGUGGACUGGAGGACUGUUCUUUUCUUUUUU
GAAGGCGGCUCGGAGGAGCGCUUCAGGGAUCCCCGGGGAAACCUGGAGCGAACUGGCAAA
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
CUUCCGCCGAGCCUCCUCGCGAAGUCCCUAGGGGCCCCUUUGGACCUCGCUUGACCGUUU
AAAGGACGGUGGGGAGUGCCCAGCGGCCGACAGGAGUAAUUCCCGCCGAAACAGGGUUUU
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
UUUCCUGCCACCCCUCACGGGUCGCCGGCUGUCCUCAUUAAGGGCGGCUUUGUCCCAAAA
CACCCUUCCUUUCUUCGGGUGUCCUUCCUCGCGCCCGCAGGACCACCCCUCGCCCCCUUU
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
GUGGGAAGGAAAGAAGCCCACAGGAAGGAGCGCGGGCGUCCUGGUGGGGAGCGGGGGAAA
GCGCUGUCGCUUCGGCUACUACCCGGUGGAAACAACUGAAGCUCCCGAGAACCGCUUUUU
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
CGCGACAGCGAAGCCGAUGAUGGGCCACCUUUGUUGACUUCGAGGGCUCUUGGCGAAAAA
CUCUAUCUUACUUGUUCCGGGGCGAGGGUGUUUAGCCCUUGGAACCGCAGUUGGUUCCU 3'
301 ---------+---------+---------+---------+---------+--------- 359
GAGAUAGAAUGAACAAGGCCCCGCUCCCACAAAUCGGGAACCUUGGCGUCAACCAAGGA 5'

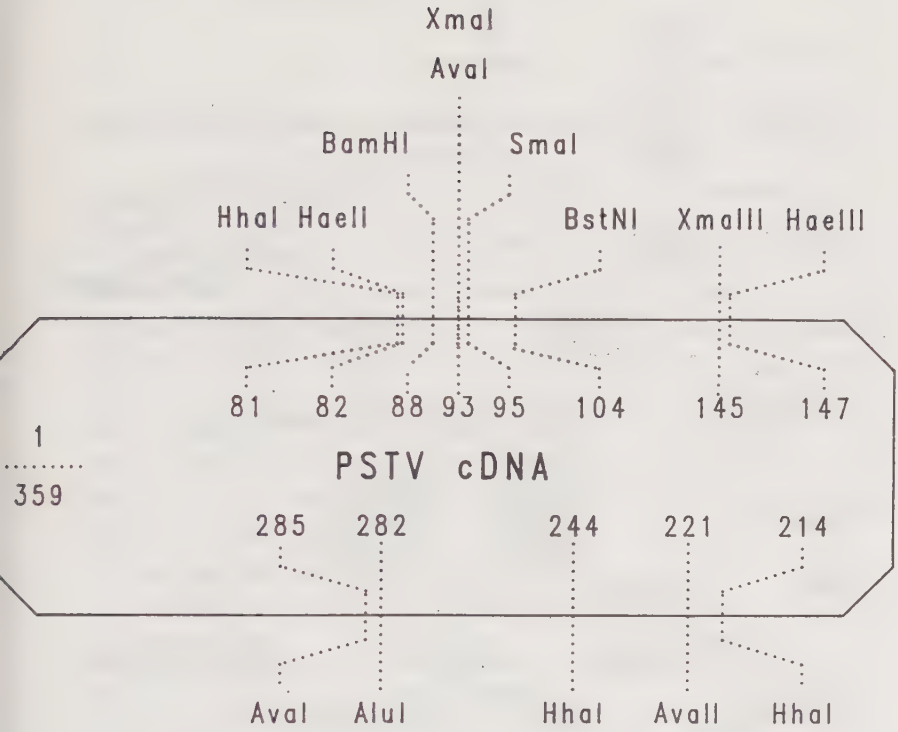


Abbildung 3: Sequenz und Restriktionskarte des PSTV-Isolates KF440-2.

Der linke Teil der Abbildung zeigt die Basensequenz der PSTV-RNA des Isolates KF440-2. Der jeweils obere Strang entspricht der PSTV (+) RNA-Sequenz, der untere entsprechend der PSTV (-) RNA-Sequenz. Das zirkuläre Molekül wurde für diese Darstellung an der Zählgrenze 359/1 "geöffnet".

Der obere Teil der Abbildung zeigt in schematischer Weise, an welchen Positionen relativ zum Sekundärstrukturmodell der PSTV-RNA die im Text erwähnten Restriktions-Erkennungssequenzen der PSTV-cDNA liegen. Die Nummern im inneren Bereich der Figur geben an, welches Nukleotid das 5'-Ende eines gegebenen Restriktionsfragmentes bildet. Das Restriktionsenzym HhaI schneidet zB die vorliegende PSTV-cDNA an drei Positionen : 80/81, 213/214 und 243/244.

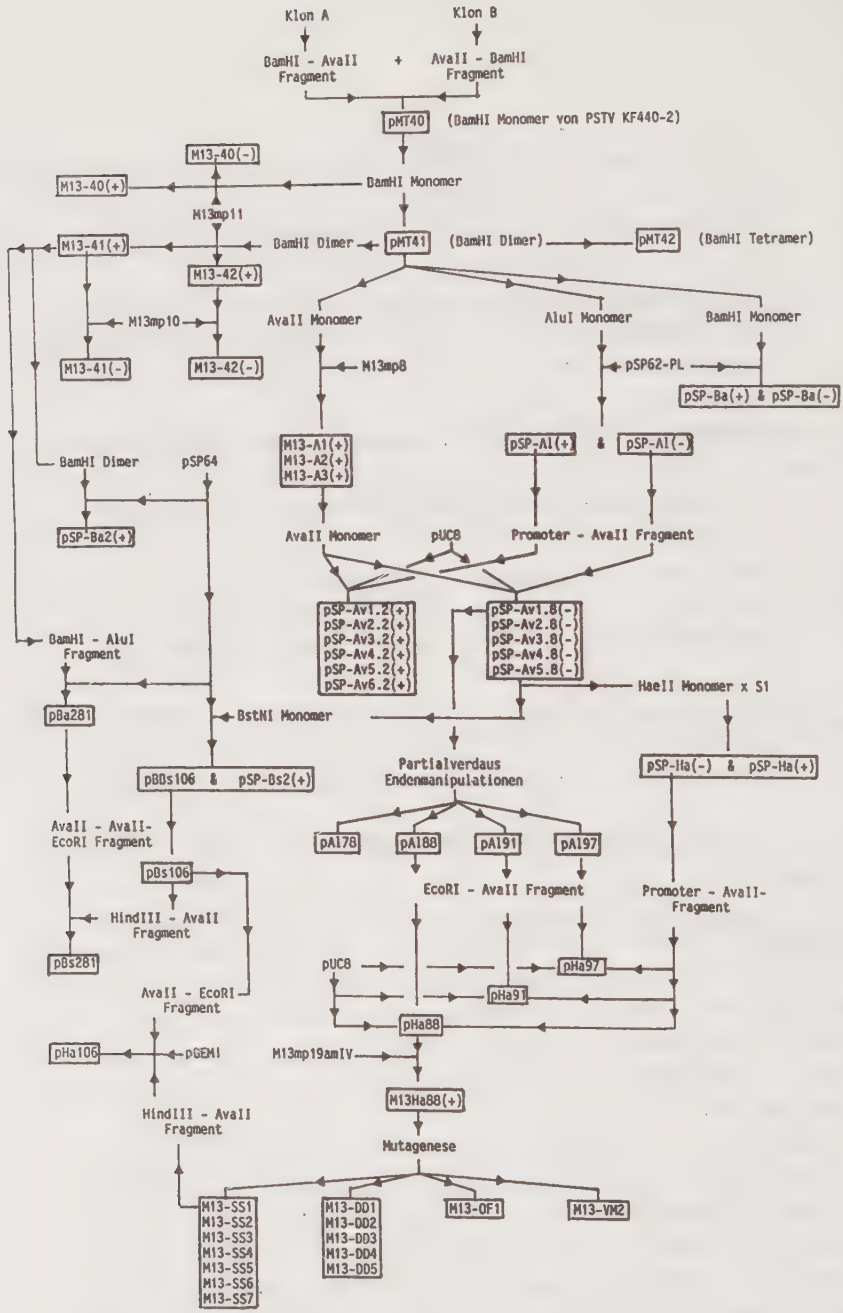


Abbildung 4: "Stammbaum" der PSTV-DNA-Klone, welche für die Infektiositätstests verwendet wurden.

Das Schema gibt an, von welchen "Eltern" die einzelnen rekombinanten PSTV-Klone abstammen.

5.1.1 **Definition von Polarität der PSTV-DNA**

Die klonierte PSTV-DNA in Plasmid pMT40 besteht aus zwei komplementären DNA-Strängen. Das Numerierungssystem von Gross et al., (1978) für die natürliche PSTV-RNA wurde auch auf die doppelsträngige PSTV-DNA übertragen. Die akkumulierende zirkuläre PSTV-RNA ist definitionsgemäß von (+) Polarität und entsprechend wurde diese Konvention auf denjenigen DNA-Strang übertragen, welcher der PSTV (+) RNA entspricht. Folglich besitzt dieser DNA-Strang (+) Polarität und der dazu komplementäre Strang (-) Polarität. Dies bedingt, daß der PSTV (+) DNA-Strang ebenso wie die PSTV-RNA in Richtung 5'-3' numeriert ist, während der PSTV (-) DNA-Strang in Richtung 3'-5' numeriert ist (vergl. Abb. 3).

5.1.2 **Definition der Insertionsorientierung der PSTV-DNA**

Bei der Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem geeigneten Vektor existieren prinzipiell zwei Möglichkeiten der Verknüpfung. Sie ist nämlich davon abhängig, welcher der beiden DNA-Stränge des Vektors mit welchem der beiden DNA-Stränge des Inserts ligiert wurde. Es ist daher nicht nur wichtig, ob ein gegebenes DNA-Fragment insertiert wurde, sondern auch in welcher "Orientierung" es mit der Vektor-DNA verknüpft wurde. Häufig ist die Art der Ligation durch die kohäsiven Enden von DNA-Fragment und Vektor-DNA von vorneherein festgelegt, so daß nur eine Orientierung der Insertion möglich ist.

Bei der PSTV-DNA wurde festgelegt, daß eine (+) Orientierung der Insertion vorliegt, sofern der DNA-Strang mit (+) Polarität mit demjenigen Vektorstrang verknüpft wird, der von 5'- nach 3'- Ende durch Konvention numeriert ist (Abb. 5). Bei einer (-) Orientierung der Insertion wird entsprechend der (-) Strang mit dem erwähnten Vektor-DNA-Strang ligiert. Betrachtet man nun zB eine PSTV-DNA, die in (+) Orientierung in die doppelsträngige M13-Phagen-DNA einkloniert wurde, so folgt unmittelbar aus dieser Definition, daß die rekombinante, einzelsträngige DNA-Form des Bakteriophagen M13 den PSTV (+) DNA-Strang enthält.

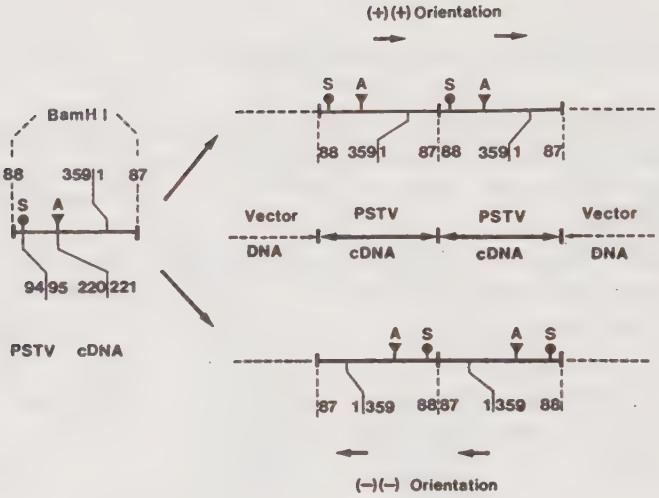


Abbildung 5:

Orientierung der Insertion und Verknüpfung von PSTV-DNA-Molekülen innnerhalb der Vektor-DNA.

Der linke Teil der Abbildung symbolisiert eine doppelsträngige BamHI-PSTV-DNA-Einheit, welche einer vollen Genomlänge des zirkulären PSTV-RNA-Moleküles mit 359 Nukleotiden entspricht. Entsprechend zu dem bei der Erstsequenzierung des PSTV von Gross et al. (1978) willkürlich festgelegten Numerierungssystem, bildet Nukleotid 88 das 5'-Ende und Nukleotid 87 das 3'-Ende des (+) Stranges der gezeigten linearen BamHI-Einheit von PSTV-DNA. Zusätzlich sind in der schematischen Darstellung auch die Schnittstellen der Restriktionsenzyme SmaI (S) und AvaII (A) aufgeführt, in ihrer relativen Position zu der Zählgrenze 359/1 im zirkulären PSTV-RNA-Molekül.

Der rechte Teil der Abbildung zeigt die beiden möglichen Orientierungen einer Insertion von zwei Kopf-Schwanz-verknüpften BamHI-Einheiten der PSTV-DNA relativ zu einer Vektor-DNA. Aufgrund der im Text aufgeführten Definition der Orientierung der Insertion, entspricht das obere Konstrukt einer (++) Orientierung der PSTV-DNA und das untere Konstrukt einer (--) Orientierung.

5.1.3 Konstruktion von PSTV-DNA Subklonen in Bakteriophage M13 oder in Plasmid pBR322

Wie bereits erwähnt wurde, ist eine Vektor-insertierte monomere PSTV-DNA-Einheit im Prinzip ein artifiziell linearisiertes Viroid-Molekül. Das an sich zirkuläre Genom liegt jetzt in "aufgeschnittener" Form vor, wobei zwei normalerweise benachbarte Nukleotide getrennt werden und nun die terminalen Nukleotide bilden. Sobald jedoch zwei Einheiten des PSTV-Genoms direkt miteinander in der "Kopf-Schwanz-Form" zu einer dimeren DNA verknüpft werden, gibt es nun wieder eine durchgängige Abfolge der Nukleotide, die mit derjenigen der zirkulären PSTV-RNA vergleichbar ist. Ein solchermaßen permutiertes dimeres Molekül erlaubt nun weiterhin das Herausschneiden vollständiger PSTV-DNA-Einheiten mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Aus diesem Grunde können daraus relativ leicht unterschiedlich "aufgeschnittene" PSTV-DNA-Monomere gewonnen werden, das heißt DNA-Moleküle mit andersartigen 5'- und 3'-Termini.

Subklonierung von BamHI-Einheiten der PSTV-DNA in pBR322 :

Um solche Kopf-Schwanz-verknüpfte Tandem-Moleküle zu erhalten, wurde die BamHI-Einheit der PSTV-DNA von Klon pMT40 aufgereinigt und erneut in die BamHI-Schnittstelle des Plasmides pBR322 kloniert. Unter den rekombinanten Transformanten befand sich auch ein Klon der, zwei BamHI-Einheiten in gewünschter dimerer Form in (--) Orientierung enthielt. Dieses rekombinante Plasmid erhielt die Bezeichnung pMT41. Durch erneute Subklonierung des dimeren BamHI-Fragmentes aus Klon pMT41 in die BamHI-Schnittstelle von pBR322 entstand das Plasmid pMT42, bei dem vier Kopf-Schwanz-verknüpfte BamHI-Einheiten der PSTV-DNA in (+) Orientierung einkloniert waren.

Subklonierung von BamHI-Einheiten der PSTV-DNA in den Bakteriophagen M13mp11 :

Sowohl das isolierte monomere BamHI-Fragment aus Klon pMT40, sowie die durch partiellen BamHI-Verdau gewonnene dimere BamHI-PSTV-DNA aus pMT41, wurden in die BamHI-Schnittstelle des Bakteriophagen M13mp11 einkloniert.

Unter den rekombinanten M13-Klonen konnten im Falle des monomeren Inserts beide möglichen Insertionen mit Hilfe von Restriktionsanalysen identifiziert werden, die gemäß der Orientierung ihres PSTV-DNA-Inserts die Bezeichnung M13-40(+) bzw M13-40(-) erhielten. Das Verhältnis von (+) zu (-) orientierten Klonen war jedoch nicht, wie erwartet, ungefähr eins, sondern etwa 3:1 zu Gunsten der (+) Orientierung.

Übereinstimmend mit der Beobachtung, daß die (+) Orientierung bevorzugt war, konnte im Falle des dimeren BamHI-PSTV-DNA-Inserts ausschließlich eine solche (++) Orientierung unter den 8 analysierten dimeren Klonen nicht aber eine (--) Orientierung gefunden werden. Sogar ein tetramerer Klon von (++++) Orientierung konnte unter den Transformanten identifiziert werden. Einer der erhaltenen dimeren Klone erhielt die Bezeichnung M13-41(+), der tetramere Klon wurde M13-42(+) genannt.

Die Beobachtung, daß eine Orientierung der Insertion bevorzugt ist, wurde später noch in ähnlich gelagerten Fällen beobachtet. Das Phänomen ist darauf zurückzuführen, daß der Polylinker der M13-Klonierungsvektoren die Sequenz aus den elf Nukleotiden GGATCCCCGGG besitzt, welche die Erkennungssequenz für die BamHI- und die SmaI-Schnittstelle enthält. Rein zufällig entspricht diese Sequenz exakt der PSTV-Sequenz zwischen den Nukleotiden 87-97 und dementsprechend liegen auch hier die BamHI- bzw SmaI-Schnittstellen der PSTV-DNA in diesem Segment. Wenn Vektor-DNA und PSTV-DNA mit BamHI geschnitten sind, entstehen daher bei beiden die gleichen Enden :

PSTV-DNA

```
     88                97          87
      G A T C C C C G G G ----//--- G          (+) Strang
            G G G C C C ----//--- C C T A G   (-) Strang
                                          91
```

M13mp11 x BamHI :

```
--- g           g a t c c c c g g g ----
--- c c t a g           g g g c c c ----
```

Eine Insertion in (+) Orientierung regeneriert die Sequenz der 11 Nukleotide und es entsteht folgende Struktur :

```
     88               97           87
--- g-G A T C C C C G G G ---- // --- G-g a t c c c c g g g ----
--- c c t a g-G G G C C C ---- // --- C C T A G-g g g c c c ----
   87                                                    97
```

In der rekombinanten M13-DNA entsteht somit eine Duplikation der 11 PSTV Nukleotide 87-97 im Abstand eines PSTV-Genomes in gleichsinniger Orientierung.

Eine Insertion in (-) Orientierung liefert dagegen folgende Struktur :

```
   92                                          87
--- g-G A T C C ---- // --- C C C G G G-g a t c c c c g g g ----
--- c c t a g-G ---- // --- G G G C C C C T A G-g g g c c c ----
            87          97        92      88
```

Hierbei entsteht nur eine Duplikation der 6 PSTV-Nukleotide 87-92. Eine solche Duplikation wird bei jeder Verknüpfung zweier DNA-Fragmente über kohäsive Enden gebildet, welche ein Restriktionsenzym erzeugt, das ebenso wie BamHI 6 Nukleotide erkennt und vier einzelsträngige Nukleotide hinterläßt.

Besonders auffällig bei der oben gezeigten (-) Orientierung der Insertion der BamHI-PSTV-DNA-Einheit ist die folgende Struktur :

```
                ---!---------Vektor----
---------- CCCGGGGA!TCCCCGGG ----------
---------- GGGCCCCT!AGGGGCCC ----------
--PSTV-DNA---------!---
          97        87
```

Hierbei handelt es sich um eine voll palindromische Struktur mit einem "inverted repeat" von 8 Nukleotiden. Es ist bekannt, daß solche palindromische Strukturen instabil sind und mit hoher Frequenz deletiert werden, insbesondere dann, wenn in vivo DNA-Reparaturprozesse durchgeführt werden (Collins, 1980). Da im vorliegenden Falle die DNA des Vektors dephosphoryliert war, um eine Selbstligation der M13-DNA zu verhindern, wurde bei der Ligasereaktion nur jeweils einer der beiden DNA-Stränge an der Übergangsstelle zwischen Insert und Vektor kovalent verknüpft. Die endgültige Ligation erfolgt normalerweise in vivo nach der Transformation in E.coli durch eben diejenigen Reparaturenzyme, die palindromische Strukturen mit hoher Frequenz deletieren. Dieser Sachverhalt erklärt, weshalb eine BamHI-PSTV-DNA-Einheit bevorzugt in (+) Orientierung in dem M13mp11 Vektor zu finden ist. Die Insertionen in (-) Orientierung werden in vivo in der Regel an der Verknüpfungsstelle so verändert, daß die rekombinante DNA dieser Klone ein nicht erwartetes Restriktionsmuster liefert. Solche Klone wurden daher bei der Restriktionsanalyse frühzeitig aussortiert.

"Turn-Around"-Klonierung der oligomeren PSTV-DNA-Inserts :

Um trotz der durch Reparaturprozesse auftretenden Schwierigkeiten rekombinante M13-Klone erhalten zu können, welche die oligomere PSTV-DNA in (-) Orientierung enthalten, wurde eine sogenannte "turn-around" Klonierung durchgeführt. Dabei wurde aus den (+) orientierten dimeren und tetrameren M13-41(+) und M13-42(+) das oligomere Kopf-Schwanz-verknüpfte BamHI-PSTV-DNA-Insert durch einen HindIII/EcoRI-Mischverdau zusammen mit den flankierenden Sequenzen des Polylinkers herausgeschnitten. Dies war deshalb möglich, weil diese beiden randständigen Restriktionsschnittstellen des Polylinkers keine Erkennungssequenz in der PSTV-DNA besitzen. Die so gewonnenen HindIII-EcoRI-Fragmente, die gleichzeitig jeweils die dimere oder

tetramere BamHI-PSTV-DNA-Einheit tragen, wurden nun in den mit HindIII und EcoRI linearisierten Vektor M13mp10 insertiert. Die beiden M13-Vektoren mp10 und mp11 unterscheiden sich nur in der Orientierung ihres Polylinkers. Aus diesem Grunde wird das PSTV-DNA-Dimer bzw das Tetramer bei der Re-Klonierung in M13mp10 zusammen mit dem Polylinker relativ zu der übrigen M13-DNA in eine andere Orientierung gebracht. Dabei bleibt die PSTV-RNA im Kontext zu den flankierenden Sequenzen des Polylinkers unbeinflußt. Auf diese Art und Weise wurden der entsprechende (-) orientierte dimere Klon M13-41(-) und der tetramere Klon M13-42(-) erhalten. Die rekombinanten einzelsträngigen DNAs beider M13-Klone enthalten den PSTV (-) Strang.

Subklonierung der AvaII-Einheit der PSTV-DNA :

Aus dem Klon pMT41 wurde die monomere PSTV-AvaII-Einheit gewonnen. Sie beginnt bei Nukleotid 221 am 5'-Terminus, geht über die 359/1 Zählgrenze und endet bei Nukleotid 220 am 3'-Terminus. Dieses Fragment wurde in die singuläre AvaII-Schnittstelle des Vektors M13mp8 einkloniert. Die AvaII-Erkennungssequenz G'G(A/T)CC gehört zu den nicht-palindromischen Restriktionsschnittstellen, die ungleiche kohäsive Enden folgenden Typs erzeugt:

```
-----GGACC-----          -----G     GACC-----
-----CCTGG-----          -----CCTG     G-----
```

oder

```
-----GGTCC-----          -----G     GTCC-----
-----CCAGG-----          -----CCAG     G-----
```

Es entstehen zwei Arten von überstehenden 5'-Enden, nämlich GAC oder GTC. Im Falle der PSTV-DNA, die nur eine AvaII-Schnittstelle besitzt, bedeutet dies, daß "linke" Enden nur mit "rechten" Enden ligierbar sind, nicht aber untereinander (vergl. Tabler 1983). Da die AvaII-Erkennungsequenz des M13mp8 G'GACC bei Nukleotid 5914/5915 in der gleichen Orientierung vorkommt wie in der PSTV-DNA, kann beim Einklonieren der PSTV-AvaII-Einheit nur die (+) Orientierung erhalten

werden (eine umgekehrte Orientierung wäre die Sequenz G'GTCC mit G'GACC im Gegenstrang). Aus prinzipiellen Gründen sind deshalb alle oligomeren Formen, die dabei entstehen, Kopf-Schwanz-verknüpft. Daher eignet sich die PSTV-AvaII-DNA-Einheit auch zur Herstellung von oligomerer DNA. Bei diesem Klonierungsexperiment wurden rekombinante M13-Klone identifiziert, die monomere, dimere und trimere AvaII-Einheiten enthielten und gemäß Länge und Orientierung die Bezeichnung M13-A1(+), M13-A2(+) und M13-A3(+) erhielten.

5.1.4 Übersicht über die verwendeten Bakteriophagen-kodierten Transkriptionssysteme und deren Vektoren

Die Entdeckung daß die RNA-Polymerasen einiger DNA-Bakteriophagen die RNA-Transkription ausschließlich an ihrem dazugehörigen Promotor initiieren, eröffnete weitreichende Möglichkeiten für die in vitro Synthese von RNA von einer klonierten cDNA-Matrize (Butler und Chamberlin, 1982; Kassavetis et al., 1982; Green et al., 1983; Krieg und Melton, 1984; siehe auch Little, 1984). Zur Entwicklung geeigneter Vektorsysteme wurde ein Bakteriophagen-kodierter Promotor auf ein Plasmid kloniert. Stromabwärts von diesem Promotor insertierte man einen Polylinker, der eine große Anzahl von Restriktionsschnittstellen innerhalb weniger Nukleotide aufweist und in den ein beliebiges Insert einkloniert werden kann (Melton et al., 1984). Das rekombinante Plasmid wird stromabwärts von der insertierten Fremd-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und für die in vitro Transkription mit der Bakteriophagen-kodierten RNA-Polymerase eingesetzt. In dieser sogenannten "run-off- Transkription" wird demgemäß eine RNA synthetisiert, welche von wenigen Fremdsequenzen am 5'- und 3'-Ende abgesehen, aus einem Transkript der einklonierten Fremd-DNA besteht.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene solcher geeigneten Vektor-Polymerasesysteme benutzt. Zunächst stand lediglich das SP6-Transkriptionssystem mit dem Vektor pSP62-PL zur Verfügung (Melton et al., 1984). Der genannte Vektor wurde von den gleichen Autoren verbessert, indem sie den Abstand von Promotor und Polylinker verkürzten und damit die mittranskribierten Fremdsequenzen verringerten (Melton et al., 1984) und gleichzeitig Promotor und Polylinker auf ein Plasmid mit hoher Kopienzahl umklonierten. Nachdem

diese resultierenden Plasmid-Vektoren pSP64 und pSP65 erhältlich waren, wurden sie ebenfalls eingesetzt. Später wurde auch noch das T7-RNA-Polymerase System benutzt, das im Prinzip dem SP6-System gleicht, jedoch den Vorteil besitzt, daß die T7-RNA-Polymerase preiswerter ist und man sie selbst auf sehr einfache Weise reinigen kann (Tabor und Richardson, 1985). Dazu wurden überwiegend die sogenannte "Geminivektoren" pGEM1 und pGEM2 benutzt, die jeweils einen Polylinker besitzen, flankiert von dem SP6-Promotor auf der einen Seite und dem T7-Promotor auf der anderen Seite. Eine in den Polylinker insertierte Fremd-DNA kann nun nach geeignetem Restriktionsschnitt wahlweise mit der SP6- oder der T7-RNA-Polymerase transkribiert werden. Auf diesem Wege ist es möglich, von einem einzigen rekominanten Plasmid die Transkripte des einklonierten Inserts in beiden Polaritäten zu erhalten. Diese Geminivektoren waren jedoch erst kommerziell erhältlich, als bereits der größte Teil der hier beschriebenen Konstruktionen abgeschlossen war.

5.1.5 Konstruktion von monomeren und oligomeren PSTV-DNA-Subklonen in SP6-Vektoren

Konstruktion der Plasmide pSP-Ba(+) und pSP-Ba(-) :

Ausgehend von Plasmid pMT41 wurde die monomere BamHI-Einheit der PSTV-DNA gewonnen und in beiden denkbaren Orientierungen in das mit BamHI linearisierte Plasmid pSP62-PL einkloniert. Auch hier wurde wieder eine Richtung der Insertion, in diesem Falle die (-) Orientierung bevorzugt, was mit dem in Kapitel 5.1.3. geschilderten Sachverhalt übereinstimmt. Gemäß der Definition der Orientierung wurden die resultierenden rekombinanten Plasmide pSP-Ba(+) und pSP-Ba(-) genannt. Werden die Plasmide mit EcoRI linearisiert, so liefern sie ein RNA-Transkript mit 69 Fremdnukleotiden am 5'-Ende. Am 3'-Ende besitzt die von pSP-Ba(+) abgeleitete (-) RNA 16 vom Vektor abgeleitete Nukleotide, während die von pSP-Ba(-) abgeleitete (+) RNA nur 12 Fremdnukleotide aufweist.

Konstruktion des Plasmides pSP-Ba2(+) :

Die dimere BamHI-Einheit des Plasmides pMT41 wurde in das Plasmid pSP64 einkloniert. Der entstehende Klon pSP-Ba2(+) hat (+) Orientierung (Abb. 11) und liefert nach Linearisierung mit EcoRI dimere PSTV (+) RNA mit 33 Fremdnukleotiden am 5'-Ende und 12 am 3'-Ende.

Konstruktion der Plasmide pSP-Al(+) und pSP-Al(-) :

Die monomere AluI-Einheit der PSTV-DNA wurde aus Klon pMT41 gewonnen. Dieses DNA-Fragment, welches sogenannte "gerade" Enden besitzt, wurde in das Plasmid pSP62-PL einkloniert, das zuvor mit HindIII geschnitten war und dessen entstehende kohäsive Enden durch Behandlung mit Klenow-Enzym ebenfalls in gerade Enden überführt wurden. Es entstanden Plasmide mit Insertionen der AluI-PSTV-DNA in beiden möglichen Orientierungen, die pSP-Al(+) und pSP-Al(-) genannt wurden. Beide Plasmide wurden zur SP6-Transkription mit SalI linearisiert (vergl. Abb. 6). In diesem Falle werden PSTV-RNA-Transkripte erhalten, die am 5'-Ende 47 und am 3'-Ende 15 Fremdnukleotide besitzen.

Konstruktion von Plasmiden der "pSP-Av-Serie" :

Die beiden Plasmide pSP-Al(+) und pSP-Al(-) dienten als Ausgangsklone für die Konstruktion von oligomeren PSTV-DNA-Klonen, welche es ermöglichen sollten, oligomere PSTV-RNAs von (+) und von (-) Polarität in vitro zu synthetisieren. Wie bereits oben erwähnt wurde, eignet sich die AvaII-Einheit der PSTV-DNA zur Herstellung von oligomeren Konstrukten, da sie nur in Kopf-Schwanz-orientierter Weise ligiert werden kann. Die AvaII-PSTV-DNA wurde durch AvaII-Verdau aus dem M13-Klon M13-A3(+) freigesetzt und von der übrigen Vektor-DNA mittels Chromatographie über Sephacryl S1000 abgetrennt.

Aus den Plasmiden pSP-Al(+) und pSP-Al(-) wurde jeweils durch einen Mischverdau mit AvaII und SalI ein DNA-Fragment erhalten, das neben dem SP6-Promotor noch einen PSTV-"Stumpf" enthält (vergl. Abb. 6). Der PSTV-spezifische Anteil des AvaII-SalI-Fragmentes beträgt 61 Nukleotide im Falle des Klones pSP-Al(+), was ca 0,2 PSTV-Einheiten entspricht und 298 Nukleotide im Falle des Klones pSP-Al(-), was ca 0,8 PSTV-Einheiten entspricht. Schrittweise wurden nun AvaII-Einheiten der PSTV-DNA an den vorhandenen PSTV-DNA-"Stumpf" anligiert, wobei dieser bereits die Orientierung der entstehenden Oligomere festlegte. Bei dieser Verfahrensweise läßt es sich nicht vermeiden, daß die zur Ligasereaktion zugegebene AvaII-DNA alleine oligomerisiert und/oder zirkularisiert. Während die Oligomerisierung durchaus erwünscht ist, handelt es sich bei der Zirkularisierung um eine Konkurrenzreaktion, die das monomere AvaII-Fragment oder bereits entstandene oligomere AvaII-Einheiten für die gewünschte Verknüpfung mit dem DNA-Promotor-Fragment unbrauchbar macht. Die Zirkularisierung als solche läßt sich natürlich nicht verhindern, da es sich um eine intramolekulare Reaktion handelt, die prinzipiell bevorzugt ist. Das Verhältnis Ligation/Zirkularisierung kann jedoch durch eine hohe Konzentration an DNA-Promotor-Fragment verbessert werden. Um angesichts der Vielzahl der potentiell entstehenden Ligationsprodukte später bei elektrophoretischer Auftrennung zwischen erwünschten und unerwünschten DNA-Molekülen unterscheiden zu können, ist es erstrebenswert, insbesondere die Entstehung von oligomeren AvaII-DNA-Zirkeln zu vermeiden. Aus den genannten Gründen wurde versucht, die vorhandene Konzentration der linearen, monomeren AvaII-PSTV-DNA-Einheit im Ligaseansatz relativ niedrig zu halten.

So wurden zu jeweils 1 ug der beiden AvaII-SalI-Fragmente der Klone pSP-Al(+) und pSP-Al(-), die von einem 2%igen Agarosegel isoliert worden waren, jeweils 0.6 ug der gereinigten 359 bp AvaII-PSTV-DNA-Einheit in Intervallen von 30 Minuten zugegeben. Nach insgesamt 20 solcher Ligationsschritte wurden die kohäsiven AvaII-Enden der Ligationsprodukte mit Hilfe von Klenow-Enzym in gerade Enden überführt und anschließend mit SalI geschnitten.

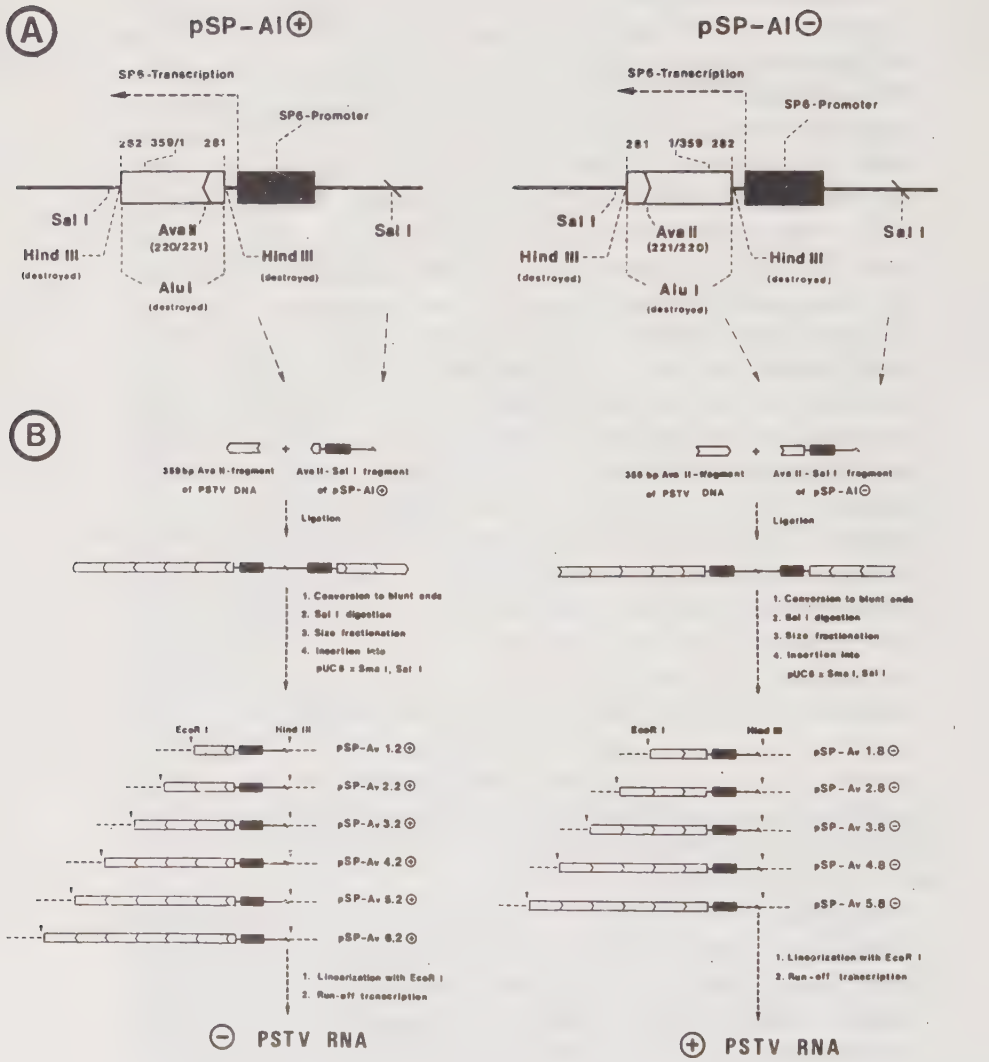
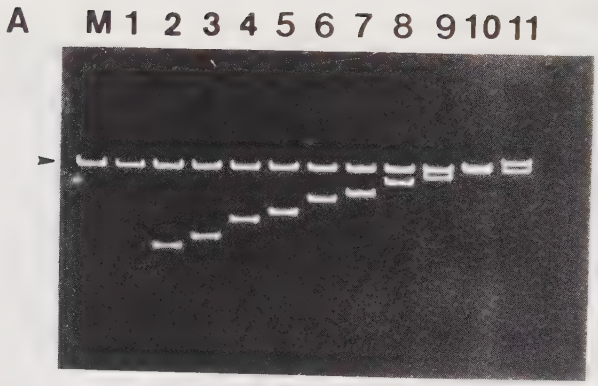
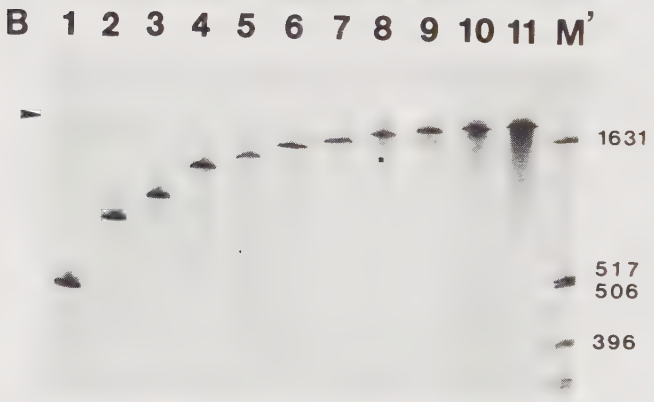

A
pSP-AI⊕
SP6-Transcription
SP6-Promoter
282 359/1 281
Sal I
Ava II
(220/221)
Hind III
(destroyed)
Alu I
(destroyed)
Hind III
(destroyed)
Sal I
pSP-AI⊖
SP6-Transcription
SP6-Promoter
281 1/359 282
Sal I
Ava II
(221/220)
Hind III
(destroyed)
Alu I
(destroyed)
Hind III
(destroyed)
Sal I
B
359bp Ava II-fragment of PSTV DNA
Ava II - Sal I fragment of pSP-AI⊕
Ligation
1. Conversion to blunt ends
2. Sal I digestion
3. Size fractionation
4. Insertion into pUC8 x Sma I, Sal I
EcoR I
Hind III
pSP-Av 1.2⊕
pSP-Av 2.2⊕
pSP-Av 3.2⊕
pSP-Av 4.2⊕
pSP-Av 5.2⊕
pSP-Av 6.2⊕
1. Linearization with EcoR I
2. Run-off transcription
⊖ PSTV RNA
360 bp Ava II-fragment of PSTV DNA
Ava II - Sal I fragment of pSP-AI⊖
Ligation
1. Conversion to blunt ends
2. Sal I digestion
3. Size fractionation
4. Insertion into pUC8 x Sma I, Sal I
EcoR I
Hind III
pSP-Av 1.8⊖
pSP-Av 2.8⊖
pSP-Av 3.8⊖
pSP-Av 4.8⊖
pSP-Av 5.8⊖
1. Linearization with EcoR I
2. Run-off transcription
⊕ PSTV RNA

Abbildung 6: Strategie für die Konstruktion von Plasmid-DNA-Klonen, welche die in vitro Synthese von PSTV-RNA mit Hilfe des SP6-Transkriptionssystemes erlauben.

Der Teil A der Abbildung zeigt die Restriktionskarte der Plasmide pSP-Al(+) und pSP-Al(-), die jeweils durch Einklonieren einer AluI-Einheit von PSTV-DNA in die aufgefüllte HindIII-Schnittstelle von Plasmid-Vektor pSP62-PL erhalten wurden. Die Position des SP6-Promotors und die Richtung der Transkription sind angezeigt. Die relative Lage der AvaII-Erkennungssequenz von PSTV-DNA bei Nukleotid 220/221 ist angegeben und ihre nicht-palindromische Natur durch die Keilform symbolisiert. Im Falle des (+) orientierten Klones pSP-Al(+) entsteht durch SP6-Transkription eine PSTV (-) RNA, deren PSTV-spezifischer Teil bei Nukleotid 281 am 5'-Ende beginnt und die bei Nukleotid 282 am 3'-Terminus endet.

Der Teil B der Abbildung zeigt die Konstruktion von Plasmid Klonen, welche die Synthese von PSTV-RNA verschiedener Länge von (-) Polarität (links) oder (+) Polarität (rechts) erlauben. Dazu wurden jeweils die AvaII-SalI-Fragmente der Plasmide pSP-Al(+) und pSP-Al(-) (A) schrittweise mit AvaII-Einheiten von PSTV-DNA verknüpft. Durch die nicht-palindromische Natur der AvaII-Erkennungssequenz kann die Ligation nur in der gezeigten festgelegten Orientierung erfolgen. Die überstehenden 5'-Enden der ligierten DNA-Fragmente wurden durch Auffüllen mit Klenow-Enzym in glatte Enden überführt. Nach Restriktionsverdau mit SalI erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Ligationsprodukte in einem Agarosegel. Daraus wurden DNA-Fragmente isoliert, bei denen 1-6 bzw 1-5 AvaII-Einheiten an das jeweilige ursprüngliche AvaII-SalI-Fragment anligiert worden waren. Diese Fragmente wurden, jedes für sich, in das Plasmid pUC8 einkloniert, welches zuvor mit SmaI und SalI linearisiert worden war. Die resultierenden Plasmide pSP-Av1.2(+) bis pSP-Av6.2(+) und pSP-Av1.8(-) bis pSP-Av5.8(-) wurden vor ihrem Einsatz in der SP6-RNA Transkriptionsreaktion mit EcoRI linearisiert. Dadurch konnten in vitro lineare PSTV-RNA-Transkripte von (-) und von (+) Polarität hergestellt werden, welche 1,2 bis 6,2 bzw 1,8 bis 5,8 Einheiten des PSTV-Genomes enthalten.


A
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11


B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M'
1631
517
506
396

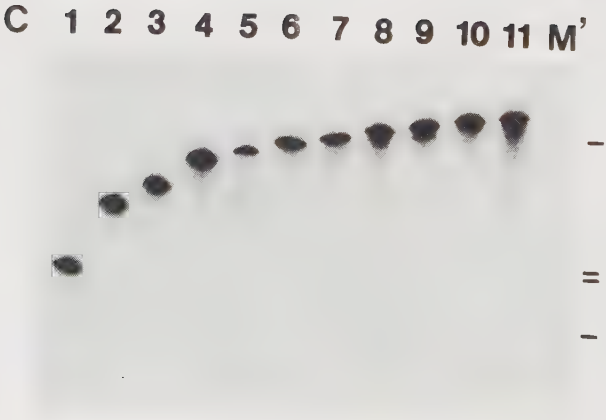

C
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M'

Abbildung 7: Elektrophoretische Analyse der zur SP6-Transkription verwendeten Matrizen-DNA und ihrer resultierenden PSTV-RNA-Transkripte.

Teil **A** zeigt die elektrophoretische Auftrennung der mit HindIII und EcoRI geschnittenen DNA der rekombinanten Plasmide aus der "pSP-Av-Serie" in einem 1%igen Agarosegel. In diesem Zustand können die entsprechenden DNAs als Matrize für die SP6- "run-off"-Transkription zur in vitro Synthese von PSTV (+) und (-) RNA eingesetzt werden. Die DNA-Fragmente wurden durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Der Restriktionsverdau setzt in allen Fällen ein Fragment frei (durch Pfeil gekennzeichnet), welches zu dem pUC8 Vektor identisch ist, der mit HindIII und EcoRI geschnitten wurde (Spur M). Das in der jeweiligen Spur anwesende zweite Fragment entspricht dem herausgeschnittenen Insert und besteht aus dem SP6-Promotor mit der davon stromabwärts gelegenen oligomeren PSTV-DNA von unterschiedlicher Länge und Orientierung. Die letztgenannten Fragmente fungieren als die eigentliche Matrize an der die SP6-Transkription abläuft.
Die DNAs wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen :

Spur 1 : pSP-Av1.2(+); Spur 2 : pSP-Av1.8(-);
Spur 3 : pSP-Av2.2(+); Spur 4 : pSP-Av2.8(-);
Spur 5 : pSP-Av3.2(+); Spur 6 : pSP-Av3.8(-);
Spur 7 : pSP-Av4.2(+); Spur 8 : pSP-Av4.8(-);
Spur 9 : pSP-Av5.2(+); Spur 10 : pSP-Av5.8(-);
Spur 11 : pSP-Av6.2(+).

Der Teil **B** zeigt die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (3,5% Acrylamid, 0,09% Bisacrylamid, 8M Harnstoff, Lauf bei 45°C) nach der Synthese von PSTV-RNA in einer analytischen SP6- Transkription. Die Nukleinsäuren wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Reaktionsansätze wurden in entsprechender Reihenfolge wie in Teil A aufgetragen. Die Hauptbanden in den Spuren 1-11 entsprechen den PSTV-RNA-Transkripten. Die dazugehörigen DNA-Matrizen, von denen die RNA-Transkripte abgelesen wurden, besitzen erheblich schwächere Intensität, was die große Effizienz der SP6-Reaktion demonstriert. Die Position der in allen Fällen auftretenden pUC8-DNA ist wie in A mit einem Pfeil gekennzeichnet. Spur M': HinfI-Fragmente von pBR322 DNA, deren Längen in Basenpaaren angegeben sind;

Der Teil **C** zeigt ein Autoradiogramm des silbergefärbten Geles von Abbildung B, in dem nur die durch SP6-RNA Polymerase synthetisierten und radioaktiv markierten PSTV-RNAs sichtbar sind. Das Autoradiogramm illustriert, daß die synthetisierten RNAs von großer Einheitlichkeit sind.

Nach Auftrennung der Ligationsprodukte in einem 1%igen Agarosegel konnten DNAs identifiziert und isoliert werden, bei denen 1-5 AvaII-Einheiten an das AvaII-SalI-Fragment des Plasmides pSP-Al(-) angefügt wurden, bzw 1-6 Einheiten an das AvaII-SalI-Fragment des Plasmides pSP-Al(+). Jedes der insgesamt 11 DNA-Fragmente wurde separat in das Plasmid pUC8 einkloniert, das zuvor mit den Enzymen SalI und dem gerade Enden erzeugenden SmaI geschnitten wurde (Abb. 6). Die Restriktionsanalyse zeigte, daß die Ligation und die sich daran anschließende Klonierung korrekt erfolgten. Mit dieser Vorgehensweise wurden zwei "Serien" von Plasmiden erhalten, die oligomere Kopf-Schwanz-verknüpfte PSTV-DNAs in (+) oder (-) Orientierung in einem SP6-Vektor enthalten und die zur in vitro Synthese von oligomerer PSTV-RNA von (-) bzw (+) Polarität geeignet sind. Aufgrund der Länge der insertierten PSTV-DNA und ihrer Orientierung erhielten die rekombinanten Plasmide die Bezeichnung pSP-Av1.2(+) bis pSP-Av6.2(+), bzw pSP-Av1.8(-) bis pSP-Av5.8(-) (siehe Abb. 6).

Alle die Plasmide der pSP-Av-Serie wurden mit EcoRI geschnitten bevor sie zur SP6-Transkription eingesetzt wurden (Abb. 7A). Die resultierenden RNAs (Abb. 7B, 7C) besitzen am 5'-Ende die gleichen 47 Fremdsequenzen wie ihre Ausgangsklone pSP-Al(+) und pSP-Al(-) und am 3'-Ende die 7 Nukleotide umfassende Sequenz GGGAAUU.

Konstruktion der Plasmide pSP-Ha(+) und pSP-Ha(-) :

Ausgehend von dem Klon pSP-Av5.8(-) wurden noch weitere rekombinante SP6-Plasmide mit monomeren PSTV-DNA-Einheiten konstruiert.

Die monomere HaeII-Einheit der PSTV-DNA wurde aus Plasmid pSP-Av5.8(-) gewonnen, mit Nuklease S1 behandelt und damit mit geraden Enden versehen und schließlich in das Plasmid pSP62-PL einkloniert, das mit HindIII linearisiert war und dessen kohäsive Enden mit Hilfe des Klenow-Enzymes in gerade Enden überführt worden waren. Entsprechend ihrer Orientierung erhielten die Plasmide die Bezeichnung pSP-Ha(+) und pSP-Ha(-). Nach Lage der Dinge hätte bei diesem Verfahren wie unten ausgeführt wird, die HindIII-Schnittstelle des Vektors regeneriert werden müssen:

Das HaeII-Fragment der PSTV-DNA hat folgendes Aussehen :

```
                    (+) Strang
5'      T T C A G------------------A G C G C  3'
  C G C G A A G T C------------------T
                    (-) Strang
        82--------------------359/1--------83
```

Der Verdau mit Nuklease S1 entfernt die überstehenden Einzelstrangenden :

```
5'      T T C A G------------------A   3'
        A A G T C------------------T
        82-----------------359/1---77
```

Das Vektor-Plasmid pSP62-PL besitzt im Bereich der HindIII-Schnittstelle folgendes Aussehen :

```
                                  <-- SP6-Transkription
-------g c c c  a a g c t t  g g g t a ----------
-------c g g g  t t c g a a  c c c a t ----------

              Hind III
```

Nach dem HindIII-Verdau entstehen die folgenden Enden :

```
-------g c c c  a          a g c t t  g g g t a ----------
-------c g g g  t t c g a          a  c c c a t ----------
```

Durch die Klenow-Reaktion werden sie in folgender Weise aufgefüllt :

```
-------g c c c  a a g c t          a g c t t  g g g t a ----
-------c g g g  t t c g a          t c g a a  c c c a t ----
```

Nach dem Einklonieren in pSP62-PL sollten theoretisch rekombinante Plasmide mit folgender Übergangssequenz entstehen :

(+) Orientierung, Klon pSP-Ha(+) :

```
                                    ◄-----SP6-Transkription

ccc a a g c t  T T C A G------------------A  a g c t t gggt
ggg t t c g a  A A G T C------------------T  t c g a a ccca
               82-----------------359/1---77
    --HindIII---                          ---HindIII--
```

(-) Orientierung, Klon pSP-Ha(-) :

```
                                    ◄----SP6-Transkription

ccc a a g c t  T------------------C T G A A  a g c t t gggt
ggg t t c g a  A------------------G A C T T  t c g a a ccca
               77-----1/359----------------82
    --HindIII---                          ---HindIII--
```

Aus dem rekombinanten Plasmid pSP-Ha(+) ließ sich tatsächlich mit HindIII ein Insert der gewünschten Größe herausschneiden, so daß angenommen werden muß, daß die Klonierung korrekt erfolgte, während das Plasmid pSP-Ha(-), welches für PSTV (+) RNA kodiert, sich mit HindIII lediglich linearisieren ließ, was darauf hindeutete, daß an einer der beiden Übergangsstellen Vektor/Insert Veränderungen auftraten. Deswegen war eine Sequenzanalyse der Übergangsstelle notwendig. Dabei wurde die Plasmid-DNA des Klones pSP-Ha(-) an der BamHI-Schnittstelle des PSTV-DNA-Inserts mit ^{32}P-markiert, mit SalI nachgeschnitten und das isolierte radioaktive Fragment nach Maxam und Gilbert (1980) sequenziert. Unten wird die erwartete und die beobachtete Sequenz aufgeführt, wobei die Sequenzen des jeweiligen SP6-RNA-Transkriptes der Vektor-DNA in Kleinbuchstaben und die der PSTV-DNA in Großbuchstaben angegeben ist. Die Position der radioaktiven Markierung ist mit einem "*" gekennzeichnet.

Die erwartete Sequenz des Klones pSP-Ha(-) nach der SP6-Transkription sollte sein :

```
5' g-------- a u u a c c c  a a g c u  U U C A G G G A U C*
   SP6-Vektor-Sequenzen     Hind III   PSTV
                                       82----------
```

Die erhaltene Sequenz war jedoch :

```
5' g-------- a u u a c c c  a a g c /   / U C A G G G A U C*
   SP6-Vektor-Sequenzen     Hind III      PSTV
                            zerstört      83----------
```

Damit zeigte sich, daß bei Klon pSP-Ha(-) gegenüber der zu erwartenden Sequenz zwei U, bzw zwei T Nukleotide deletiert wurden. Im vorliegenden Falle bedeutet dies, daß der PSTV-spezifische Teil der dazugehörigen SP6-RNA erst mit Nukleotid 83 beginnt, statt wie angenommen mit Nukleotid 82. Diese Deletion ist für die Infektiosität dieser RNA von Bedeutung, wie im einzelnen im Abschnitt 5.4.3. beschrieben wird.

Konstruktion der Plasmide pBBs106 und pSP-Bs2(+):

Aus dem Plasmid pSP-Av5.8(-) wurde weiterhin die monomere BstNI-Einheit der PSTV-DNA gewonnen. Das Restriktionsenzym BstNI erkennt die Sequenz CC'(AT)GG und schneidet in der PSTV-DNA bei Nukleotid 103/104. Nachdem die kohäsiven Enden des BstNI-Fragmentes durch Auffüllen mit Klenow-Enzym in gerade Enden überführt worden waren, erfolgte die Ligation mit dem durch SmaI linearisierten Plasmid pSP64. Nach Transformation wurden rekombinante Klone identifiziert, deren Plasmide eine oder zwei Kopf-Schwanz-verknüpfte BstNI-PSTV-DNA-Einheiten in (+) Orientierung insertiert hatten. Das Plasmid mit einer BstNI-Einheit erhielt die Bezeichnung pBBs106, das dimere Plasmid die Bezeichnung pSP-Bs2(+). Da es für die unten beschriebenen Infektiositätstest von Wichtigkeit ist, soll kurz auf die Sequenzen im Übergangsbereich Vektor/PSTV-DNA eingegangen werden.

Die BstNI-Einheit der PSTV-DNA hat folgendes Aussehen :

```
                (+) Strang
104          110            359/1        100      104
 T G G  A G C G A ---------------- G G A A A  C C
   C C  T C G C T ----------------C C T T T  G G A
                (-) Strang
```

Nach Auffüllen mit Klenow-Enzym wird je ein A bzw ein T eingefügt :

```
104          110            359/1        100      104
 T G G  A G C G A ---------------- G G A A A  C C T
 A C C  T C G C T ---------------- C C T T T  G G A
```

Der mit SmaI linearisierte Vektor pSP64 hat folgendes Aussehen :

```
-- g g a t c c c c     g g g --
-- c c t a g g g g     c c c --
```

Das rekombinante Plasmid pBBs106 sollte dementsprechend folgende Sequenz besitzen :

```
SP6-Transkription -------►
                  104                          359/1   100     104
-- g g a t c c c c T G G A G C ---------------- A A A C C T c c c --
-- c c t a g g g g A C C T C G ---------------- T T T G G A g g g --
              ---------                                  ---------
             102  BstNI                                 BstNI  106
```

Damit wird ersichtlich, daß sich zwei BstNI-Schnittstellen regenerieren sollten, was auch tatsächlich der Fall war. In der Konsequenz bedeutet dies, daß der PSTV-spezifische Teil der resultierenden SP6-RNA am 5'-Ende bereits mit dem Nukleotid 102 beginnt und am 3'-Ende erst bei Nukleotid 106 endet, obwohl die zwei jeweils "randständigen" Nukleotide eigentlich von der Vektor-DNA

stammen. Der PSTV-spezifische Teil ist also im Bereich von Nukleotid 102-106 dupliziert.

Weiterhin fällt an der oben aufgeführten Sequenz auf, daß die vom Vektor abgeleiteten Fremdnukleotide ggatcccc, die am 5'-Ende des SP6-Transkriptes den PSTV-Nukleotiden vorangehen, exakt der PSTV-Sequenz zwischen den Nukleotiden 87-94 entsprechen. Dieser Bereich der PSTV-Sequenz liegt im SP6-RNA-Transkript des Klones pBBs106 in der Nähe des 3'-Endes.

Betrachten wir nun noch den dimeren Klon pSP-Bs2(+). Die Übergangsstellen Vektor-DNA/PSTV-DNA sind identisch wie für Klon pBBs106 beschrieben. Interessant ist jedoch die Übergangsstelle zwischen den beiden aufgefüllten BstNI-PSTV-DNA-Einheiten, die folgendes Aussehen haben:

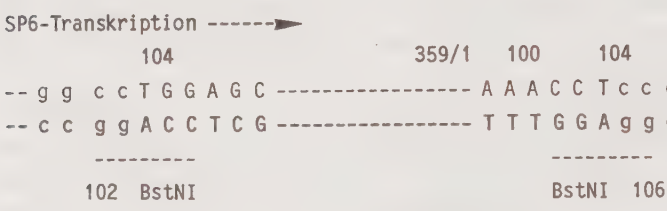
```
                100    102 104
------ G G A A A  C C T  T G G  A G C G A ------
------ C C T T T  G G A  A C C  T C G C T ------
                              104 106      110
```

Dabei wird deutlich, daß an dieser Übergangsstelle die BstNI-Erkennungssequenz nicht wieder regeneriert wird und daß das Nukleotid 104 nun zweimal vorhanden ist. Deshalb handelt es sich bei Klon pSP-Bs2(+) um einen dimeren Klon mit einer internen Insertion von einem Nukleotid. Da nur die randständigen BstNI-Erkennungssequenzen regeneriert wurden, nicht aber die interne BstNI-Region, wurde nun durch den BstNI-Verdau des Plasmides pSP-Bs2(+) ein Fragment mit der Länge eines PSTV-DNA-Dimers freigesetzt. Durch Sequenzierung der fraglichen Übergangsstelle wurde bestätigt, daß ein T-Nukleotid zwischen T_{104} und G_{105} insertiert wurde.

Konstruktion des Plasmides pBs106 durch Deletion der BamHI-Schnittstelle von Plasmid pBBs106 :

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Duplikation der PSTV-spezifischen Nukleotide 87-94 störende Einflüsse bei den später beschriebenen Infektiositätstests haben konnte, sollte die vom Vektor abgeleitete Sequenz ggatcccc entfernt werden. Dieser Bereich aus 8 Nukleotiden enthält die Erkennungsregion für die BamHI-Schnittstelle,

stelle, die auf dem Plasmid pBBs106 insgesamt zweimal vorkommt, d.h. vor und innerhalb der PSTV-Sequenz. Durch einen partiellen BamHI-Verdau mit anschließender Behandlung durch Nuklease S1 wurde der Klon pBs106 erzeugt, dessen Plasmid folgendes Aussehen besitzt :



Die Regeneration der BstNI-Schnittstelle, sowie der Beginn des PSTV-spezifischen Teils des SP6-Transkriptes bei Nukleotid 102 bleibt von der durchgeführten Manipulation unberührt.

5.1.6 Konstruktion von PSTV-DNA Subklonen in SP6-Vektoren mit langen duplizierten Bereichen

Der PSTV-spezifische Teil des SP6-RNA-Transkriptes von Plasmid pSP-Av1.8(-) beginnt mit Nukleotid 282 am 5'-Ende und erstreckt sich über die Zählgrenze 359/1 bis Nukleotid 281, was einer vollständigen Genomlänge entspricht und reicht schließlich erneut von Nukleotid 282 über die Zählgrenze hinweg zu Nukleotid 223. Insgesamt enthält die SP6-RNA von Klon pSP-Av1.8(-) also 1,8 Einheiten der PSTV (+) RNA, wobei der Bereich der Nukleotide 282-(359/1)-223 dupliziert vorliegt (vergl. Konstrukt A in Abb. 8):

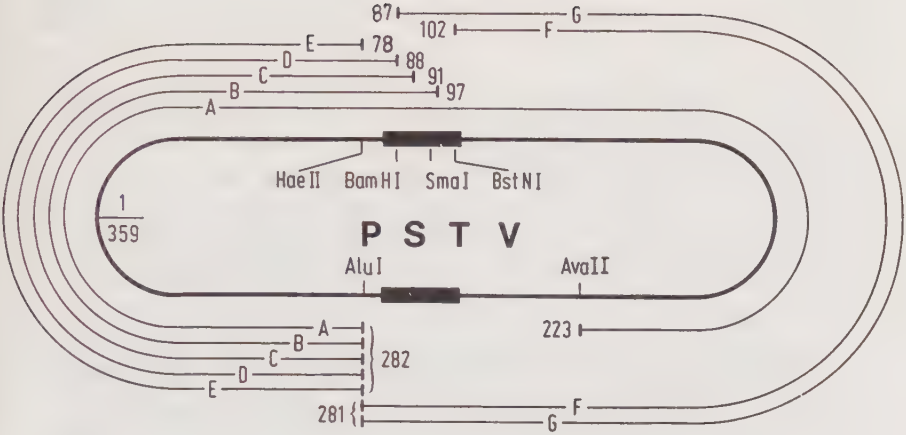


Abbildung 8: Schematische Darstellung der duplizierten Bereiche verschiedener SP6- RNA-Transkripte.

Die geschlossene innere Figur der Abbildung symbolisiert das PSTV-RNA-Molekül. Die Zählgrenze 359/1 ist angegeben, ebenso wie die Lage einiger Restriktionserkennungssequenzen, soweit sie für die Konstruktion der verschiedenen DNA-Klone relevant sind. Die verstärkt gezeichneten Bereiche in der Mitte des PSTV-Moleküles entsprechen der Position der zentralen konservierten Region. Die dünnen Linien außerhalb des PSTV-Moleküles entsprechen den duplizierten Bereichen, wie sie in den SP6-RNA- Transkripten von verschiedenen Konstrukten erzeugt werden. Die 5'- und die 3'-Enden der jeweiligen duplizierten Region sind angegeben. Die Leseart der Abbildung soll an einem Beispiel genauer verdeutlicht werden. Bei dem RNA-Transkript von Konstrukt A beginnt die PSTV-spezifische Sequenz am 5'-Ende bei Nukleotid 282. Es folgt eine volle Genomlänge der PSTV-RNA über die Zählgrenze 359/1 bis Nukleotid 281. Anschließend folgt der hier wiedergegebene Bereich von Nukleotid 282 über 359/1 zu Nukleotid 223 am 3'-Ende. Dieser Bereich entspricht dem duplizierten PSTV-Bereich dieses RNA-Transkriptes. In einer alternativen Betrachtungsweise kann man die Abbildung so interpretieren, daß zunächst der duplizierte Bereich von 282 über 359/1 bis 223 am 5'-Ende der RNA liegt, gefolgt von einer weiteren genomischen Einheit von Nukleotid 224 über 359/1 zu Nukleotid 223 am 3'- Ende. Beide Betrachtungsweisen sind gleichwertig.

Die hier gezeigten Konstrukte entsprechen im einzelnen den folgenden Klonen :

A : pSP-Av1.8(-) B : pAl97 C : pAl91 D : pAl88
E : pAl78 F : pBs281 G : pBa281

SP6-RNA von pSP-Av1.8(-) abgeleitet :

5' 282---359/1----------281/282---359/1----------223
----- eine PSTV Einheit ---- -/-- 0,8 PSTV Einheiten ----

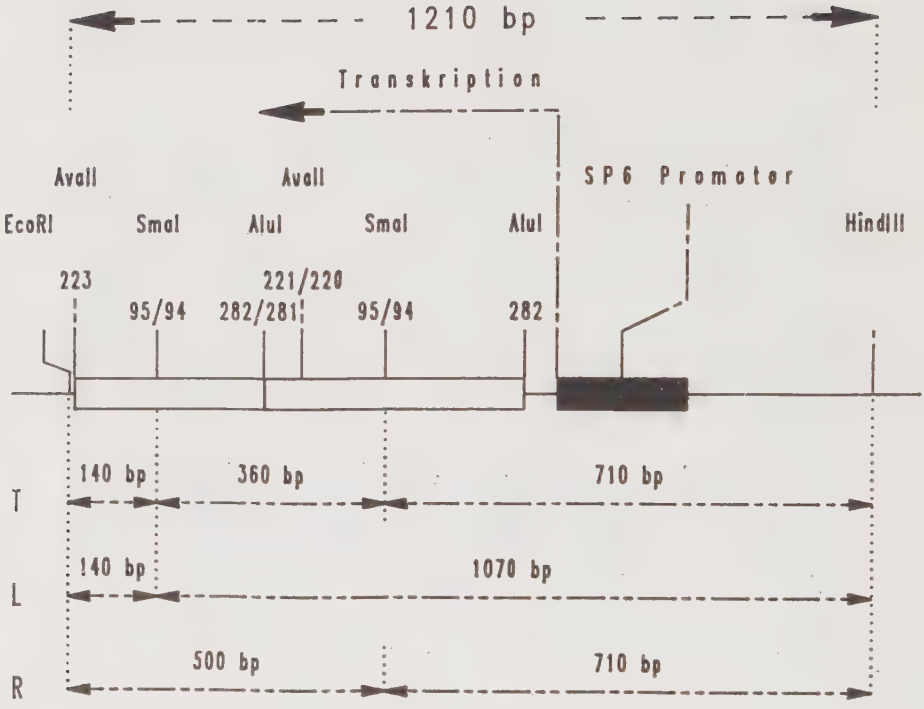
Bei den im folgenden beschriebenen Plasmiden wurde ausgehend von Plasmid pSP-Av1.8(-) der duplizierte Bereich verkleinert. Der PSTV-Anteil aller daraus resultierenden Plasmide beginnt wie bei Plasmid pSP-Av1.8(-) bei Nukleotid 282 und umfaßt nach wie vor mehr als eine Genomlänge. Der 3'-terminale Bereich der Duplikation sollte in der Region der sogenannten "zentralen konservierten Region" um die Nukleotide 80-100 enden. In diesem Bereich gibt es im wesentlichen 4 Restriktionserkennungssequenzen, die zu Manipulationen genutzt werden können:

1. SmaI schneidet zwischen den Nukleotiden 94/95
2. XmaI schneidet zwischen den Nukleotiden 92/93
3. BamHI schneidet zwischen den Nukleotiden 87/88
4. HaeII schneidet zwischen den Nukleotiden 81/82

Die genannten Schnittstellen liegen im duplizierten Bereich der PSTV-DNA und kommen somit mindestens zweimal auf dem Plasmid pSP-Av1.8(-) vor. HaeII schneidet zudem noch relativ häufig innerhalb der Vektor-DNA. Da jeweils lediglich die bezüglich der SP6- Transkription stromabwärts gelegene Erkennungssequenz geschnitten werden sollte, waren Partialverdaus nötig. Als Beispiel soll das Vorgehen im Falle der SmaI-Schnittstelle im Detail beschrieben werden (vergl. Abb. 9)

Verkürzung des Plasmides pSP-Av1.8(-) an der SmaI-Schnittstelle :

Zunächst wurde das EcoRI-HindIII-Fragment aus Klon pSP-Av1.8(-) isoliert, das neben der PSTV-DNA von 1,8 Genom-Einheiten noch den SP6-Promotor, sowie einige Sequenzen aus pBR322 umfaßt. Insgesamt ist dieses Fragment ca 1210 Nukleotide lang (siehe Abb. 9). Das DNA-Fragment enthält die SmaI-Schnittstelle der PSTV-DNA in zweifacher Form. Folglich entstehen bei quantitativem SmaI-Verdau drei Fragmente mit Nukleotidlängen von ca 710, 359 und ca 140 bp. Wird lediglich die Schnittstelle stromabwärts geschnitten, entstehen 2 Fragmente mit den Nukleotidlängen ca 1070 (=710+359) und 140 bp. Wird lediglich die andere der beiden Erkennungsregionen verdaut, so entstehen ebenfalls zwei Fragmente mit ca 710 bzw ca 500 (=359+140) bp. Ein Partialverdau wird ein Gemisch aller dieser Fragmente liefern und es galt, daraus das gewünschte Fragment, das an der stromabwärtsgelegenen SmaI-Erkennungssequenz verdaut wurde und eine Kettenlänge von 1070 Nukleotiden umfaßt zu isolieren (Abb. 9). Dieses Fragment besitzt an beiden Seiten unterschiedliche Enden, die durch den SmaI-Verdau einerseits und durch den HindIII-Verdau andererseits entstanden sind. In diesem Falle wurde das DNA-Fragment nach Verdau mit PstI in das Plasmid pUC8 einkloniert, das mit SmaI sowie mit PstI geschnitten worden war. Auf diese Weise entstand das Plasmid pAl97 (Abb 8, Konstrukt B; siehe auch Abb. 10).


1210 bp
Transkription
AvaII
AvaII
SP6 Promotor
EcoRI
SmaI
AluI
SmaI
AluI
HindIII
223
95/94
282/281
221/220
95/94
282
140 bp
360 bp
710 bp
T
140 bp
1070 bp
L
500 bp
710 bp
R

pSP-Av1.8(-)

Abbildung 9: Restriktionskarte des Plasmides pSP-Av1.8(-).

Das Schema zeigt einen Abschnitt der Restriktionskarte von Plasmid pSP-Av1.8(-). Die Lage des SP6-Promotors und die Richtung der Transkription ist angegeben. Stromabwärts vom Promotor liegen 1,8 Einheiten der PSTV-DNA, welche durch ein weiß umrandetes Rechteck symbolisiert ist. Die übrigen Vektorsequenzen sind als dünne Linie wiedergegeben. Die Position der PSTV-Nukleotide, sowie die Lage der SmaI-, AvaII- und AluI-Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Die randständigen AvaII- bzw AluI-Schnittstellen der PSTV-cDNA an den Übergängen PSTV-DNA/Vektor-DNA sind jeweils zerstört.

Durch einen Mischverdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII wird ein DNA-Fragment von ca 1210 bp* freigesetzt. Der anschließende vollständige Verdau mit SmaI (T) liefert drei Fragmente mit einer Länge von ca 140, 360 und 710 bp*. Ein partieller Verdau an der "linken", also der bezüglich des SP6-Promotors stromabwärts gelegenen SmaI-Schnittstelle, liefert zwei Fragmente mit einer Länge von 140 und 1070 bp* (L). Der entsprechende Partialverdau an der "rechten" SmaI-Schnittstelle liefert zwei Fragmente mit ca 500, bzw 710 bp* (R). Für die geschilderten Deletionsversuche war es erwünscht, das 1070 bp* Fragment zu isolieren.

Zur Vereinfachung wurden alle angegebenen Fragmentlängen auf- bzw abgerundet.

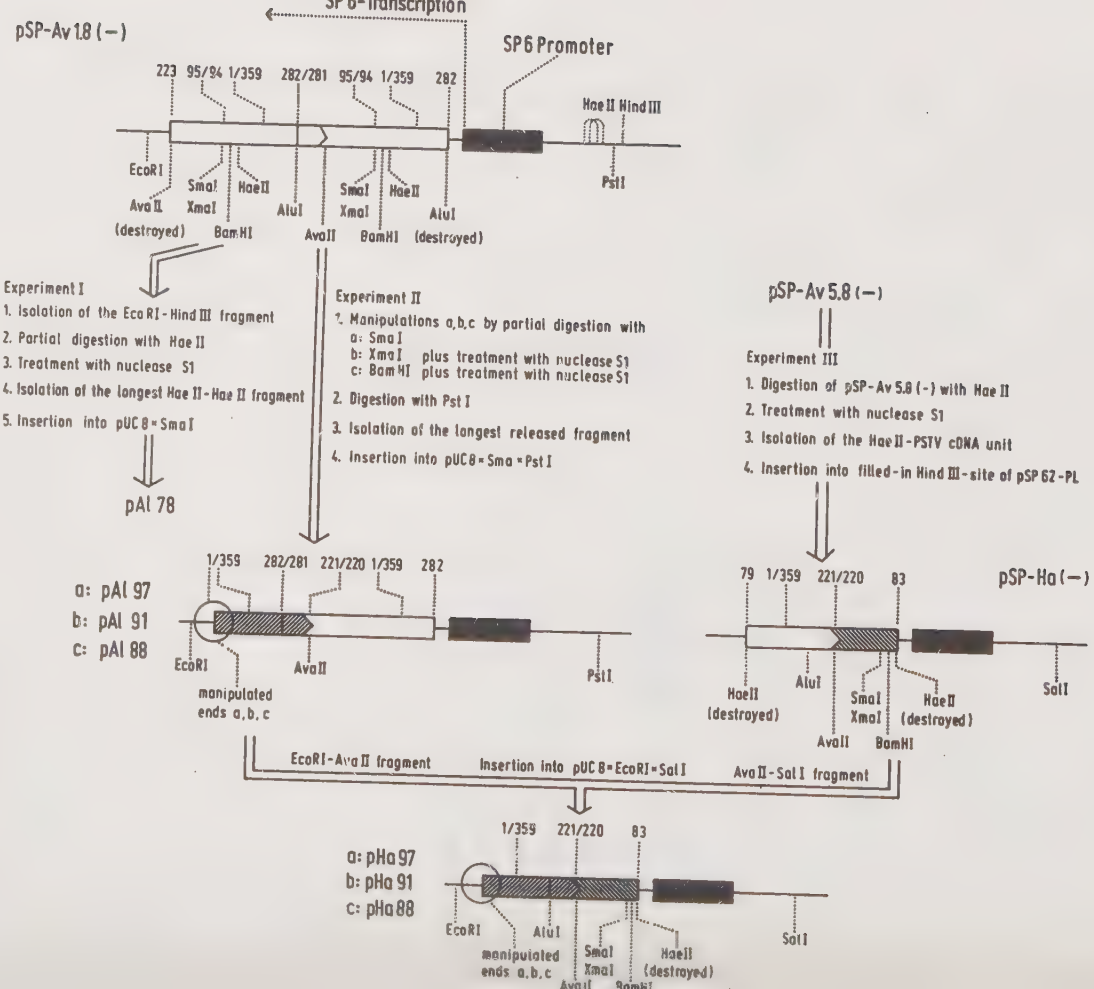

SP 6-transcription
pSP-Av 1.8 (−)
SP6 Promoter
223 95/94 1/359 282/281 95/94 1/359 282
Hae II Hind III
EcoR I
Ava II (destroyed)
Sma I Xma I
BamHI
Hae II
AluI
AvaII
Sma I Xma I
BamHI
Hae II
AluI (destroyed)
Pst I
Experiment I
1. Isolation of the EcoRI-Hind III fragment
2. Partial digestion with Hae II
3. Treatment with nuclease S1
4. Isolation of the longest Hae II-Hae II fragment
5. Insertion into pUC 8 × Sma I
pAI 78
Experiment II
1. Manipulations a,b,c by partial digestion with
a: Sma I
b: Xma I plus treatment with nuclease S1
c: BamHI plus treatment with nuclease S1
2. Digestion with Pst I
3. Isolation of the longest released fragment
4. Insertion into pUC 8 × Sma × Pst I
pSP-Av 5.8 (−)
Experiment III
1. Digestion of pSP-Av 5.8 (-) with Hae II
2. Treatment with nuclease S1
3. Isolation of the Hae II-PSTV cDNA unit
4. Insertion into filled-in Hind III-site of pSP 62-PL
a: pAI 97
b: pAI 91
c: pAI 88
1/359 282/281 221/220 1/359 282
EcoRI
manipulated ends a,b,c
AvaII
Pst I
79 1/359 221/220 83
pSP-Ha (−)
Hae II (destroyed)
AluI
Sma I Xma I
Hae II (destroyed)
Sal I
AvaII
BamHI
EcoRI-AvaII fragment
Insertion into pUC 8 × EcoRI × Sal I
AvaII-Sal I fragment
a: pHa 97
b: pHa 91
c: pHa 88
1/359 221/220 83
EcoRI
manipulated ends a,b,c
AluI
Sma I Xma I
AvaII
BamHI
Hae II (destroyed)
Sal I

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Konstruktion von Plasmiden der "pAl-Serie" und der daraus resultierenden "pHa-Serie".

Der obere Teil der Abbildung zeigt einen Abschnitt der Restriktionskarte von Plasmid pSP-Av1.8(-). Die Lage des SP6-Promotors und die Richtung der Transkription sind angegeben. Stromabwärts vom Promotor liegen 1,8 Einheiten der PSTV-DNA, welche durch ein weiß umrandetes Rechteck symbolisiert ist. Die übrigen Vektorsequenzen sind als dünne Linie wiedergegeben. Die Position der PSTV-Nukleotide, sowie die Lage der für die geschilderte Konstruktion relevanten Restriktionsschnittstellen sind gekennzeichnet. Da bei der PSTV-DNA in Plasmid pSP-Av1.8(-) die Nukleotide 282-359/1-223 dupliziert vorliegen, sind zwangsläufig auch die in diesem Bereich vorhandenen Restriktionsschnittstellen dupliziert.

In **Experiment** I sollte die PSTV-DNA an der zweiten stromabwärts gelegenen HaeII-Schnittstelle deletiert werden. Da HaeII auch auf der übrigen Vektor-DNA recht häufig schneidet, wurde zunächst das EcoRI-HindIII-Fragment isoliert (1) und anschließend ein partieller HaeII-Verdau durchgeführt (2). Nach Behandlung mit Nuklease S1 (3) erfolgte die Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem Agarosegel. Unter den zahlreichen entstehenden, partiell verdauten Reaktionsprodukten ließ sich jedoch das längstmögliche HaeII-HaeII-Fragment aufgrund seiner bekannten Länge identifizieren und isolieren (4). Durch Insertion in Plasmid pUC8 (5), welches mit SmaI linearisiert worden war, wurde Plasmid pAl78 erzeugt.

In **Experiment** II wurden drei veschiedene Partialverdaus mit der zirkulären DNA von Plasmid pSP-Av1.8(-) durchgeführt. Dabei wurde zum einen mit SmaI geschnitten (1a) und zum anderen mit den Enzymen XmaI (1b) bzw BamHI (1c). Im Anschluß an den Restriktionsverdau mit den beiden letztgenannten Enzymen erfolgte zusätzlich eine Behandlung mit Nuklease S1. Zur Weiterbehandlung wurde die entsprechende DNA in allen drei Fällen quantitativ mit PstI verdaut (2). Das längste der von der Vektor-DNA freigesetzten Fragmente, welches der gewünschten DNA entsprach, wurde nach elektrophoretischer Auftrennung isoliert (3) und in das Plamsid pUC8 einkloniert, welches mit SmaI und PstI geschnitten war (4). Auf diese Weise wurden die Plasmide pAl97, pAl91 bzw pAl88 erhalten. Eine Restriktionskarte dieser Plasmide ist angegeben und die Position der manipulierten Enden durch einen Kreis gekennzeichnet.

In **Experiment III** wurde aus dem Plasmid pSP-Av5.8(-), welches 5,8 Kopf-Schwanz-verknüpfte PSTV-DNA-Einheiten enthält, durch Restriktionsverdau die HaeII-Einheit von PSTV-DNA freigesetzt (1) und anschließend mit Nuklease S1 behandelt (2). Nach Isolation des entsprechenden Fragmentes von einem Agarosegel (3) erfolgte die Insertion in das Plasmid pSP62-PL (4), welches zuvor mit HindIII geschnitten wurde und dessen kohäsive Enden mit Hilfe von Klenow-Enzym in gerade Enden überführt worden waren. Die Restriktionskarte des resultierenden Plasmides pSP-Ha(-) ist angegeben.

Schließlich wurden die Plasmide der "pAl-Serie" mit dem Plasmid pSP-Ha(-) rekombiniert (unterer Teil der Abbildung). Die besondere nicht-palindromische Struktur der AvaII-Erkennungssequenz, symbolisiert durch die Keilform, erleichterte eine solche Neukombination. Es wurde aus den Klonen pAl97, pAl91 bzw pAl88 jeweils das EcoRI-AvaII-Fragment isoliert und mit dem AvaII-SalI-Fragment von pSP-Ha(-) gemeinsam in das Plasmid pUC8 einkloniert, welches mit EcoRI und SalI geschnitten worden war. Die kohäsiven AvaII-Enden erlaubten nur eine Orientierung der Ligation. Auf diese Weise entstanden die Klone pHa97, pHa91 bzw pHa88. Die schraffierten Flächen geben an, welche Bereiche der PSTV-DNA aus den Klonen der "pAl-Serie" und von pSP-Ha(-) für die Neukombination verwendet wurden. Schließlich wurden mit den Plasmiden der "pHa-Serie" DNA-Matrizen erzeugt, bei denen die SP6-Transkription die in vitro Synthese von RNAs erlauben, deren PSTV-spezifischer Bereich bei Nukleotid 83 am 5'-Ende beginnt und nach Durchlaufen einer gesamten PSTV-Einheit bei Nukleotid 88, 91 bzw 97 am 3'-Ende abschließt.

Verkürzung des Plasmides pSP-Av1.8(-) an der XmaI- und BamHI-Schnittstelle :

In einem weiteren Experiment wurde ein durch entsprechenden XmaI-Partialverdau gewonnenes Fragment mit Nuklease S1 behandelt, was sowohl das kohäsive XmaI-, als auch das kohäsive HindIII-Ende zerstörte und in gerade Enden überführte (Abb. 10). Anschließend wurde durch Verdau mit PstI, welches nicht in der PSTV-Sequenz schneidet, wieder ein kohäsives Ende erzeugt. Dieses solchermaßen behandelte DNA-Fragment wurde nun in das Plasmid pUC8 einkloniert, das mit dem gerade Enden erzeugenden SmaI, sowie mit PstI geschnitten war. Der resultierende Klon erhielt die Bezeichnung pAl91 (Konstrukt C, Abb. 8).

In analoger Weise wurde ebenso wie der XmaI-Partialverdau ein BamHI-Partialverdau durchgeführt, gefolgt von einer Behandlung mit Nuklease S1. Das resultierende DNA-Fragment wurde nun ebenso analog zum vorherigen Experiment nach PstI-Verdau in das mit SmaI und PstI geschnitttene Plasmid pUC8 einkloniert. Auf diese Art und Weise wurde der Klon pAl88 erhalten (Konstrukt D, Abb. 8; siehe auch Abb. 10).

Übergangssequenzen zwischen PSTV- und Vektor-Sequenz :

Im folgenden Abschnitt soll betrachtet werden, wie die genauen PSTV/Vektor-Übergangssequenzen am 3'-Ende in den SP6-Transkripten aussehen, die von den eben beschriebenen Plasmiden abgeleitet sind.

Sequenz von pSP-Av1.8(-) an der SmaI-, XmaI- und BamHI-Schnittstelle :

```
          ---SmaI----          <--------SP6-Transkription
          ----XmaI---
                   ---BamHI---
--100-----------------------------------82--
---T T C  C C C G G G G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
---A A G  G G G C C C C T A G G  G A C T T---  (+) Strang
```

Das DNA-Fragment, das nach partiellem SmaI-Verdau erhalten wird, hat folgendes Aussehen :

```
                94----------------------82--
                G G G G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
                C C C C T A G G  G A C T T---  (+) Strang
```

Nach Einklonieren in die SmaI-Schnittstelle entsteht folgende DNA :

```
---EcoRI---
          ----SmaI---
          97----94----------------------82--
g a a t t c c c G G G G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
c t t a a g g g C C C C T A G G  G A C T T---  (+) Strang
```

Die SmaI-Schnittstelle wird regeneriert, der PSTV-spezifische Teil des SP6-Transkriptes von Klon pAI97 endet bei Nukleotid 97.

Wird nach dem partiellen XmaI-Verdau mit Nuklease S1 behandelt und die entstehende DNA in die SmaI-Schnittstelle kloniert, sollte folgendes Produkt entstehen :

Das DNA-Fragment, das nach partiellem XmaI-Verdau erhalten wird, hat dieses Aussehen :

```
          96--------------------------82--
          C C G G G G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
                C C T A G G  G A C T T---  (+) Strang
```

Nach Verdau mit Nuklease S1 und nach Einklonieren in das Plasmid pUC8:

```
                92------------------82--
   g a a t t c c c G G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
   c t t a a g g g C C T A G G  G A C T T---  (+) Strang
```

Wie die Sequenzanalyse nach Maxam und Gilbert jedoch zeigte, war Nukleotid 92 deletiert, so daß tatsächlich folgende Übergangssequenz entstand :

```
                 91----------------82--
     g a a t t c c c G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
     c t t a a g g g C T A G G  G A C T T---  (+) Strang
```

Bei dem SP6-RNA-Transkript aus Klon pA191 endet der PSTV-spezifische Teil somit bei Nukleotid 91.

Schließlich soll noch die Entstehung des Klones pA188 beschrieben werden:
Nach partiellem BamHI-Verdau entsteht folgende DNA :

```
                87---------82--
      G A T C C  C T G A A---  (-) Strang
                G  G A C T T---  (+) Strang
```

Nach Entfernung der Einzelstrang-Enden mit Nuklease S1 hat das Fragment folgendes Aussehen :

```
                87---------82--
                C  C T G A A---  (-) Strang
                G  G A C T T---  (+) Strang
```

Die rekombinante DNA sollte folgende Sequenz haben :

```
             88-----------82--
g a a t t c c c C  C T G A A---  (-) Strang
c t t a a g g g G  G A C T T---  (+) Strang
```

Dies entspricht exakt der Sequenz die bei Klon pA188 nach Sequenzanalyse beobachtet wurde. Hier endet also der PSTV-spezifische Teil des SP6-Transkriptes bei Nukleotid 88.

Verkürzung des Plasmides pSP-Av1.8(-) an der HaeII-Schnittstelle :

Zu Anfang des Kapitels wurde erwähnt, daß sich auch die HaeII-Schnittstelle prinzipiell für die Verkürzung der duplizierten Region des Klones pSP-Av1.8(-) eignet. Ein Partialverdau, wie er mit XmaI und BamHI durchgeführt wurde, ist ungleich schwieriger, da das isolierte EcoRI-HindIII-Fragment außer den HaeII-Schnittstellen in der PSTV-DNA noch vier eng benachbarte Erkennungssequenzen für HaeII besitzt. Es entstand durch partiellen Verdau mit HaeII ein sehr komplexes Muster an DNAs verschiedener Längen. Dabei konnte ein Fragment identifiziert werden, welches dem längst-möglichen HaeII-HaeII-Fragment entspricht. Dieses DNA-Fragment wurde durch Behandlung mit Nuklease S1 mit geraden

Enden versehen und in die SmaI-Schnittstelle des Plasmides pUC8 kloniert. Die Restriktionsanalyse des resultierenden Plasmides pAl78 ergab, daß die PSTV-DNA hier in (+) Orientierung rekloniert wurde. Durch Sequenzierung nach Maxam und Gilbert wurde die Übergangssequenz bestimmt :

```
SP6-Transkription -------►
          -- 70--------------78
(+) Strang  -- T C G G A G G A g  g a t c c --
(-) Strang  -- A G C C T C C T c  c t a g g --
```

Der PSTV-spezifische Teil des SP6-RNA-Transkriptes von Plasmid pAl78 endet bei Nukleotid 78.

Übersicht über die SP6-Klone mit duplizierten "linken" PSTV-Teilen:

Insgesamt wurden also von Plasmid pSP-Av1.8(-) ausgehend vier verkürzte Plasmide erhalten, deren SP6-Transkripte folgende PSTV-spezifische Teile enthalten :

```
          - eine PSTV-DNA-Einheit --
pAl97: 5' 282--------359/1-------281/282-----------359/1------97  3'

pAl91: 5' 282--------359/1-------281/282-----------359/1-----91   3'

pAl88: 5' 282--------359/1-------281/282-----------359/1----88    3'

pAl78: 5' 282--------359/1-------281/282-----------359/1---78     3'
          - eine PSTV-DNA-Einheit --
```

SP6-Klone mit duplizierten "rechten" PSTV-Teilen :

Bei der pAl-Serie liegt im wesentlichen der "linke" Teil des PSTV-Moleküles in duplizierter Form vor (vergl. Abb. 8). Zur Konstruktion von Plasmiden, die einen "rechten" Teil in duplizierter Form besaßen wurde aus dem Klon M13-41(+) das HindIII-EcoRI-Fragment isoliert, das die zwei Kopf-Schwanz-verknüpften BamHI-Einheiten der PSTV-DNA trägt und dessen Restriktionskarte folgendermaßen aussieht (siehe auch Klon pSP-Ba2(+), Abb. 11) :

```
HindIII-BamHI-----------AluI-----BamHI-----------AluI-----BamHI-EcoRI
        - eine PSTV-DNA-Einheit -- eine PSTV-DNA-Einheit -
```

Durch partiellen AluI-Verdau konnte das nachfolgend aufgeführte DNA-Fragment gewonnen werden :

```
HindIII-BamHI-----------AluI-----BamHI-----------AluI
        - eine PSTV-DNA-Einheit -
```

Dieses verkürzte Fragment wurde in das Plasmid pSP64 einkloniert, das mit HindIII und SmaI geschnitten war. Im resultierenden Plasmid pBa281 startet der PSTV-spezifische Teil des dazugehörigen SP6-Transkriptes bei Nukleotid 87 und nach Durchlaufen eines vollen PSTV-Genoms endet das Transkript in der "zweiten Runde" bei Nukleotid 281:

```
pBa281: 5' 87------------359/1-----86/87---------281  3'
          - eine PSTV-DNA-Einheit --
```

Der duplizierte Teil der SP6-RNA des Klones pBa281 ist daher praktisch genau komplementär zu dem duplizierten Teil von Plasmid pAl88 (Konstrukt G Abb. 8, Abb. 11).

Das Plasmid pBa281 sollte so manipuliert werden, daß die dazugehörige SP6-RNA am 5'-Ende verkürzt würde, aber am 3'-Ende unbeeinflußt bleibt. Ausgehend vom dem isolierten HindIII-EcoRI -Fragment des Plasmides pBa281 wurde durch einen partiellen AvaII-Verdau folgendes Fragment isoliert :

HindIII-EcoRI-Fragment von pBa281 :

HindIII-BamHI-BstNI---AvaII--AluI-----BamHI-BstNI---AvaII--AluI-EcoRI
---- eine PSTV-DNA-Einheit ---

nach partiellem AvaII-Verdau :

AvaII--AluI-----BamHI-BstNI---AvaII--AluI-EcoRI
---- eine PSTV-DNA-Einheit ---

Dieses Fragment wurde zusammen mit dem HindIII-AvaII-Fragment aus Plasmid pBs106 ligiert und in das Plasmid pSP64 einkloniert, woraus der Klon pBs281 resultierte (Abb. 8, Abb. 11) :

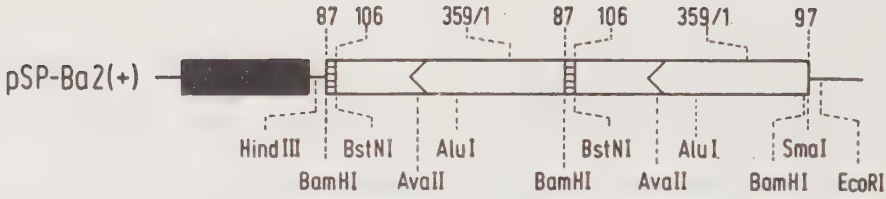
HindIII-BstNI---AvaII--AluI-----BamHI-BstNI---AvaII--AluI-EcoRI
---- eine PSTV-DNA-Einheit ---

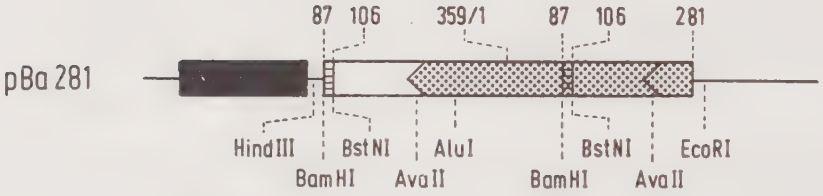
Der PSTV-spezifische Teil des SP6-Transkriptes von Plasmid pBs281 sieht demgemäß folgendermaßen aus (siehe auch Konstrukt F Abb. 8) :

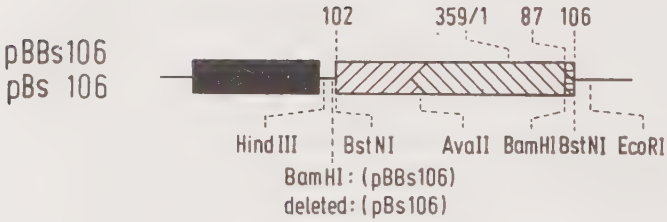
pBs281: 5' 102----------359/1-----101/102---------281 3'
--- eine PSTV-DNA-Einheit --

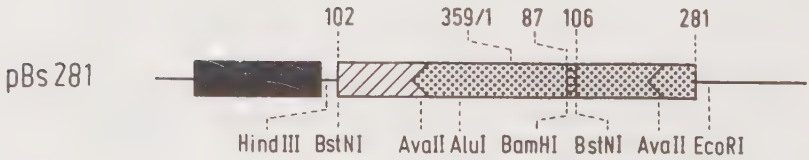
5.1.7 Konstruktion von PSTV-DNA Subklonen in SP6-Vektoren mit kurzen duplizierten Bereichen innerhalb der zentralen konservierten Region

Es sollten PSTV-DNA-Klone in SP6-Vektoren konstruiert werden, welche die Synthese von PSTV-RNAs mit relativ kurzen duplizierten Bereichen innerhalb der zentralen konservierten Region ermöglichen. Dabei wurden bereits vorhandene SP6-Klone in geeigneter Weise rekombiniert. So wurde das AvaII-SalI-Fragment des Plasmides pSP-Ha(-), das den SP6-Promotor, sowie die PSTV-DNA von Nukleotid 83 bis zur AvaII Schnittstelle besitzt, jeweils mit den AvaII-EcoRI-Fragmenten der Plasmide pAl88, pAl91 und pAl97 verknüpft (vergl. Abb. 10).


pSP-Ba2(+)
87 106 359/1 87 106 359/1 97
HindIII BstNI AluI BstNI AluI SmaI
BamHI AvaII BamHI AvaII BamHI EcoRI


pBa 281
87 106 359/1 87 106 281
HindIII BstNI AluI BstNI EcoRI
BamHI AvaII BamHI AvaII


pBBs106
pBs 106
102 359/1 87 106
HindIII BstNI AvaII BamHI BstNI EcoRI
BamHI : (pBBs106)
deleted: (pBs106)


pBs 281
102 359/1 87 106 281
HindIII BstNI AvaII AluI BamHI BstNI AvaII EcoRI

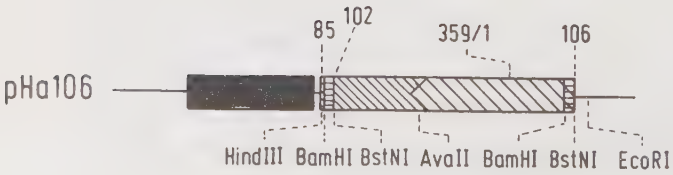

pHa106
85 102 359/1 106
HindIII BamHI BstNI AvaII BamHI BstNI EcoRI

Abbildung 11: Restriktionskartenausschnitte einiger Plasmide, in denen PSTV-DNA stromabwärts von einem SP6-Promotor kloniert ist.

In allen aufgeführten Plasmiden ist die PSTV-DNA (weiß umrandete Fläche), deren randständige Nukleotide jeweils aufgezeigt sind, in (+) Orientierung einkloniert. Bei Transkription beginnend vom SP6-Promotor (schwarze Fläche, Transkriptionsrichtung : nach rechts) werden PSTV (+) RNAs synthetisiert. Bei Klon pSP-Ba2(+) folgen, wie angegeben zwei BamHI-PSTV-DNA-Einheiten stromabwärts des SP6-Promotors. Die Position der relevanten Restriktionsschnittstellen ist angegeben. Der Bereich zwischen der BamHI- und der BstNI-Erkennungsregion zwischen den Nukleotiden 87-106 schließt den größten Teil der oberen zentralen konservierten Region von PSTV ein und ist hier und bei den folgenden Karten waagerecht schraffiert. Die Lage der AvaII-Schnittstelle ist hier und ebenfalls in den folgenden Karten durch einen Keil gekennzeichnet, welcher gleichzeitig die nicht-palindromische Natur dieser Erkennungsregion symbolisiert. Klon pBa 281 entspricht, in dem zum SP6-Promotor zugewandten Teil, dem Klon pSP-Ba2(+). Die PSTV-Sequenz endet jedoch an der 2. AluI-Schnittstelle bei Nukleotid 281. Die Klone pBBs106 und pBs106 enthalten beide die BstNI-Einheit der PSTV-DNA. In beiden Fällen befindet sich der Bereich der oberen zentralen konservierten Region am 3'-Ende des resultierenden SP6-RNA-Transkriptes. Die BamHI-Schnittstelle zwischen dem SP6-Promotor und der PSTV-DNA ist bei Plasmid pBBs106 intakt, während sie bei Plasmid pBs106 zerstört ist. Das Plasmid pBs281 entstand durch Verknüpfung des HindIII-AvaII-Fragmentes aus dem Plasmid pBa281 und dem AvaII- EcoRI-Fragment von Plasmid pBs106 (siehe markierte Flächen). Das Plasmid pBs281, welches nur ein unerheblich kürzeres PSTV-DNA-Insert enthält als Plasmid pBa281, besitzt jedoch im Gegensatz zu dem letztgenannten Plasmid nur einmal den Bereich der oberen zentralen konservierten Region von PSTV. Das Plasmid pHa106 wurde durch Verknüpfung des HindIII-AvaII-Fragmentes aus M13-SS1 mit dem AvaII-EcoRI-Fragment aus Klon pBs106 (siehe grob schraffierte Fläche) hergestellt. Der M13-Klon M13-SS1 ist ein Abkömmling des Klones pHa88 (siehe Abbildung 10). Der Klon pHa106 enthält kaum mehr als eine monomere PSTV-DNA-Einheit, besitzt aber die obere zentrale konservierte Region in duplizierter Form.

Die verknüpften Fragmente wurden in das mit SalI und EcoRI geschnittene Plasmid pUC8 einkloniert. Auf diese Weise entstanden die Plasmide pHa88, pHa91 und pHa97, deren PSTV-spezifischer Teil in den resultierenden SP6-Transkripten so aussieht :

```
pHa88: 5' 83------------------82/83--88    3'

pHa91: 5' 83------------------82/83---91   3'

pHa97: 5' 83------------------82/83----97  3'
          -- eine PSTV Einheit --
```

Die duplizierten PSTV-Sequenzen der Klone der pHa-Serie sind auch in Abb. 15 wiedergegeben.

Ein Plasmid, das die zentrale konservierte Region in möglichst exakt duplizierter Form besitzt, konnte konstruiert werden, nachdem der Klon pHa88 bei Nukleotid 84 mutiert worden war, so daß im Klon M13-SS1 eine HindIII-Schnittstelle entstand, wie im Kapitel über zielgerichtete Mutagenese (5.5) noch im einzelnen beschrieben wird. Aus diesem Klon wurde das HindIII-AvaII-Fragment der PSTV-DNA isoliert, mit dem AvaII-EcoRI-Fragment aus Klon pBs106 verknüpft und in den mit HindIII und EcoRI geschnittenen Vektor pGEM1 kloniert. Der PSTV-spezifische Teil des SP6-Transkriptes des daraus entstehenden Klones pHa106 hat folgendes Aussehen (Abb. 11) :

```
pHa106: 5' 85------------------84/85----106   3'
          -- eine PSTV Einheit --
```

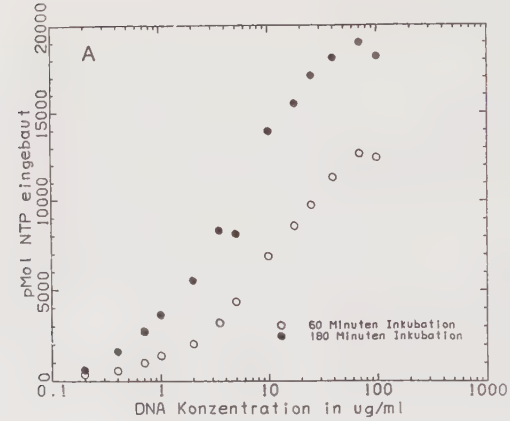
Der duplizierte Bereich der PSTV-Sequenz dieses Plasmides ist ebenfalls in Abb. 15 zu sehen.

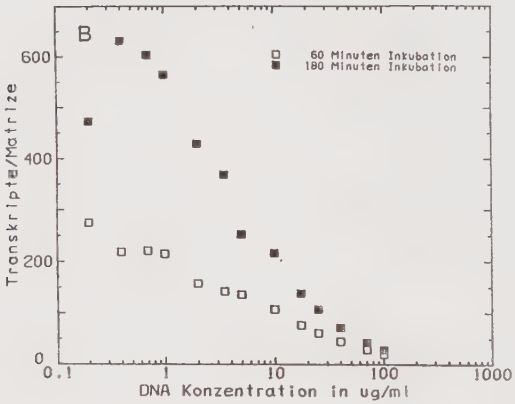
5.2 Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase

Nachdem die ersten PSTV-DNA-Klone in SP6-Vektoren konstruiert worden waren, galt es, die Transkriptionsreaktion mit der SP6-RNA-Polymerase möglichst effizient durchzuführen. Dazu wurden zunächst die Bedingungen von Green et al. (1983) angewendet. Es zeigte sich allerdings, daß die Menge der produzierten RNAs stark von Experiment zu Experiment schwankte. Der Zusatz von Rinderserumalbumin in den Transkriptionspuffer führte dann zu reproduzierbaren Resultaten. Angesichts der großen Menge an in vitro Transkripten, die für die Infektiositätsversuche benötigt wurden, sollte die Konzentration an DNA-Matrize, sowie die Reaktionszeit bestimmt werden, bei der die synthetisierte RNA-Menge am größten ist. Abb. 12A zeigt die Syntheserate in Abhängigkeit von der Konzentration der DNA-Matrize. Bei einer eingesetzten DNA-Konzentration von ca 70 ug/ml ergab sich ein relativ breites Optimum der synthetisierten absoluten RNA-Menge. Die Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Stunden ergab in dem optimalen Konzentrationsbereich eine beachtliche Steigerung der produzierten RNAs um ca 50%.

Betrachtet man die spezifische Ausbeute, das heißt die Menge an RNA- Molekülen, die pro DNA-Matrize synthetisiert wurden (Abb. 12B), so sieht man, daß bei niedrigen DNA-Konzentrationen bis zu 600 RNA-Kopien produziert werden und daß der Einbau nahezu linear zu der verwendeten Reaktionszeit erfolgt. Bei DNA-Konzentrationen über 10 ug/ml nimmt die Transkriptionsrate pro Matrize stark ab, obwohl die Gesamtausbeute bis 70 ug/ml steigt. Bei diesen DNA-Konzentrationen nimmt die relative Neusynthese in der zweiten und dritten Stunde in gleichem Sinne ab.

Wie in Abb. 12C zu sehen ist, haben lange Inkubationszeiten und hohe DNA-Konzentrationen keinen Einfluß auf die Qualität der synthetisierten SP6-RNAs.


A
pMol NTP eingebaut
20000
15000
10000
5000
0
0.1
1
10
100
1000
DNA Konzentration in ug/ml
60 Minuten Inkubation
180 Minuten Inkubation


B
Transkripte/Matrize
600
400
200
0
0.1
1
10
100
1000
DNA Konzentration in ug/ml
60 Minuten Inkubation
180 Minuten Inkubation

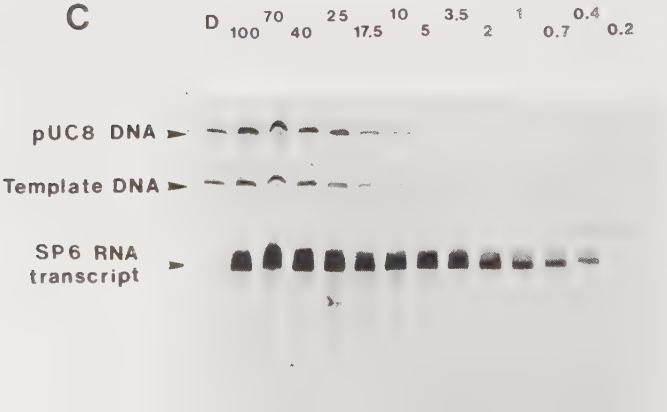

C
D 100 70 40 25 17.5 10 5 3.5 2 1 0.7 0.4 0.2
pUC8 DNA
Template DNA
SP6 RNA transcript

Abbildung 12: Analyse der absoluten und der spezifischen Syntheserate von PSTV-RNA durch SP6-RNA Polymerase in Abhängigkeit von der Konzentration an DNA-Matrize.

Für die Versuche in dieser Abbildung wurde die mit HindIII und EcoRI geschnittene DNA des Plasmides pSP-Av2.2(+) als DNA-Matrize verwendet. Nach Durchführung einer analytischen SP6-Transkription erfolgte die Abtrennung von freien NTPs von synthetisierter RNA und deren quantitative Bestimmung durch Messung der Radioaktivität in beiden Fraktionen.

Teil A zeigt die Beziehung zwischen der Konzentration an DNA-Matrize und der absoluten Einbaurate bei 60 bzw 180 Minuten (offene, bzw geschlossene Kreise). Im Gesamtreaktionsansatz waren 40.000 pMole NTP vorhanden. Bei einer DNA-Konzentration von ca 70 ug/ml erreichte die Einbaurate ihr Maximum. Dabei wurden nahezu 50% der verfügbaren NTPs in RNA eingebaut.

Teil B zeigt den Verlauf der spezifischen Einbaurate in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration bei 60 und bei 180 Minuten (offene, bzw geschlossene Quadrate). Aus der in Teil A aufgeführten Einbaurate und aus der bekannten Kettenlänge des Syntheseproduktes läßt sich die Anzahl der synthetisierten PSTV-RNA-Moleküle berechnen, sofern einheitliche Produkte entstehen. Aus der bekannten DNA-Konzentration und deren Molekulargewicht läßt sich die Anzahl der Matrizenmoleküle berechnen. Auf der Ordinate ist das Verhältnis von synthetisierten PSTV-RNA-Molekülen pro DNA-Matrizenmolekül angegeben. Bei geringen DNA-Konzentrationen und entsprechend langer Reaktionszeit kann demzufolge ein einzelnes DNA-Molekül bis zu 600 mal transkribiert werden. Diese spezifische Syntheserate sinkt bei höheren DNA-Konzentrationen auf unter 50 Kopien ab.

Der Teil C zeigt die Auftrennung der Transkriptionsprodukte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (3,5% Acrylamid, 0,09% Bisacrylamid, 8M Harnstoff, Lauf bei 45°C). Die Produkte wurden durch Silber gefärbt. Spur D: Plasmid-DNA von pSP-Av2.2(+) mit EcoRI und HindIII geschnitten; das größere Fragment besteht aus pUC8 DNA, das kleinere Fragment dient als die eigentliche DNA-Matrize. Spuren 100 - 0,2 : Die Konzentration an Matrizen-DNA wurde zwischen 100 ug/ml und 0,2 ug/ml variiert. "Aliquots" der entsprechenden Reaktionen wurden nach 180 Minuten Inkubationszeit entnommen und wie über den entsprechenden Gelbahnen angegeben ohne DNase Behandlung auf das Gel aufgetragen. Die hohe Effektivität der SP6-Reaktion, wie sie in Teil A und B quantitativ bestimmt wurde, wird im gefärbten Gel durch die stark unterschiedlichen Intensitäten von RNA-Produkt und DNA-Matrize direkt sichtbar. Es ist ebenso deutlich, daß die Einheitlichkeit der synthetisierten RNAs nicht durch die Konzentration an DNA-Matrize beeinflußt wird.

Als Konsequenz dieser Vorversuche wurde in den folgenden präparativen SP6-Transkriptionen stets eine Reaktionszeit von 3 Stunden verwendet. Noch längere Reaktionszeiten brachten keinen nennenswerten Zuwachs an Neusynthese. Um eine reine RNA zu erhalten, muß die DNA-Matrize im Anschluß an die SP6-Transkription durch DNase beseitigt werden. Deshalb wurde bei präparativen RNA-Synthesen eine DNA-Konzentration von 20 ug/ml eingesetzt. Damit wird einerseits die DNA-Komponente nach der Reaktion relativ einfach und schonend abgebaut und andererseits erhält man so nahezu die optimale RNA-Menge.

5.3 Infektiositätsstudien mit klonierten DNAs des PSTV-Isolates KF440-2

Nach der Klonierung des PSTV-RNA-Genomes in Form seiner cDNA, war es für den Fortgang der Experimente wichtig zu erfahren, ob die auf gentechnologischem Wege hergestellte DNA auch biologisch aktiv, d.h. infektiös sein würde. Es wurde daher im biologischen Test geprüft, ob nach einer mechanischen Inokulation von Tomatenpflanzen durch "Blatt-Abreibung" mit einer klonierten PSTV-DNA in Gegenwart von Karborund anschließend Viroidinfektionen zu beobachten sein würden und mit welchen Konstrukten dies gegebenfalls gelingt. Weiterhin erhob sich die Frage, ob die klonierte PSTV-DNA selbst replikationsfähig sein würde oder ob sie lediglich die Replikation der PSTV-RNA in Gang setzten würde, die normalerweise auf dem RNA-RNA Wege ohne Beteiligung einer PSTV-spezifischen DNA abläuft (Branch und Dickson, 1980; Zaitlin et al., 1980).

Darüberhinaus eröffnet erst die Infektiosität der klonierten PSTV-cDNA die Möglichkeit, zu einer replikationsfähigen Viroid-Nachkommenschaft zu gelangen und auf diesem Wege die ganze Palette molekularbiologischer Techniken der Manipulation von DNA, einschließlich gezielter Mutagenese für die Aufklärung der Struktur- Funktionsbeziehungen von Viroiden einzusetzen.

5.3.1 Infektiositätstests von vollständigen doppelsträngigen PSTV-DNA-Genomen

Die isolierten DNAs von rekombinanten Klonen, die verschiedene Formen von PSTV-DNA enthielten, wurden mechanisch auf Tomatenpflanzen inokuliert ("abgerieben"). Von denjenigen DNAs, bei denen eine mögliche Infektiosität zu erwarten war, erfolgten auch Tests mit 10-fach verdünnten DNA-Konzentrationen. Pro Test wurden 10 etwa 3-wöchige Tomatenpflanzen eingesetzt. Zwei bis drei Wochen nach der Inokulation erschienen dann die ersten Symptome einer PSTV-Infektion, die sich zuerst in Krümmungen (Epinastie), Verformung und Nekrose der Blätter zeigte und schließlich von einer allgemeinen Wuchshemmung und Stauchung der gesamten Pflanze gefolgt war.

Tabelle 2 enthält die Resultate dieses Biotestes mit klonierter doppelsträngiger PSTV-DNA, die teilweise vor ihrer Inokulation noch mit Restriktionsendonukleasen oder anderen Nukleasen "behandelt" wurden.

Es zeigte sich, daß dimere oder höher oligomere Formen von doppelsträngiger in Plasmid pBR322 und in Bakteriophage M13-klonierter PSTV-DNA infektiös waren. Dabei war es gleichgültig, ob die für die Inokulation verwendete PSTV-DNA in der Vektor-DNA insertiert blieb (Tabelle 2, Nr.3,9 und 14) oder ob sie mit geeigneten Restriktionsenzymen herausgeschnitten wurde (Tabelle 2, Nr. 10). Im letzteren Falle bestand das DNA-Fragment, das durch einen Mischverdau mit HindIII und EcoRI aus Klon M13-42(+) gewonnen wurde, aus vier Kopf-Schwanz-verknüpften monomeren PSTV-DNA-Einheiten mit kurzen flankierenden Sequenzen aus dem Polylinker des M13-Vektors.

Die rekombinanten DNAs von vier verschiedenen Klonen, die eine monomere PSTV-DNA-Einheit enthielten, erwiesen sich ebenfalls als infektiös. Ihre spezifische Infektiosität war jedoch erheblich geringer als die der rekombinanten dimeren DNAs (Tabelle 2, Nr.1,7,8 und 11). Dabei erwies sich allerdings die DNA des Klones M13-40(+), der die monomere BamHI-DNA in (+) Orientierung in M13mp11 enthält, als signifikant höher infektiös als die anderen monomeren DNAs (Tabelle 2,

Nr.7).

Die spezifische Infektiosität dieser rekombinanten monomeren DNAs stieg allerdings sprunghaft an, sobald ihr monomeres PSTV-DNA-Insert vor der Inokulation durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten wurde (vergl. Tabelle 2, Nr.1 mit 2 und Nr. 11 mit 12 und 13). Hingegen blieb die spezifische Infektiosität der freigesetzten monomeren AvaII-PSTV-DNA-Einheit unbeeinflußt, gleichgültig, ob sie zusammen mit der Vektor-DNA oder in gereinigter Form alleine inokuliert wurde (Tabelle 2, Nr. 12 und 13).

Bei allen diesen Versuchen bestand zunächst die Möglichkeit, daß die beobachtete PSTV-Infektion nicht durch die inokulierte PSTV-DNA hervorgerufen wird, sondern durch eine Verunreinigung dieser DNA mit Spuren von PSTV-spezifischer RNA. Sofern E.coli eine PSTV-"Passagier"-DNA trägt, könnten solche RNA-Transkripte durchaus synthetisiert worden sein, die bei der DNA-Präparation nicht vollständig entfernt wurden. Aus diesem Grunde wurden einige DNAs vor ihrer Inokulation mit DNase-freier RNaseA behandelt und teilweise ebenso mit RNase-freier DNaseI. Dabei zeigte sich, daß die Vorbehandlung mit RNase praktisch keinerlei Einfluß auf die Infektiosität hatte (Tabelle 2, Nr. 3 und 4), während die Behandlung mit DNase die Infektiosität beseitigte (Tabelle 2, Nr. 5). Der Verdau mit Nuklease S1, welche einzelsträngige DNA sowie RNA abbaut, führte nicht zur Beseitigung der Infektiosität. Diese Kontrollversuche zeigten, daß tatsächlich eine doppelsträngige DNA die PSTV-Infektionen auslöste. Kontrollpflanzen, die mit den Vektor-DNAs alleine infiziert wurden, entwickelten keine PSTV-Symptome (Tabelle 2, Nr. 6 und 15).

Insgesamt zeigte sich, daß doppelsträngige PSTV-DNAs infektiös sind, wobei bei den oligomeren Vektor-insertierten DNAs einige 100ng ausreichten, um eine PSTV-Infektion hervorzurufen, während bei gereinigter PSTV-DNA bei Inokulationen mit 30ng und sogar mit 3ng noch Infektionen beobachtet wurden (Tabelle 2, Nr. 10).

Tabelle 2: Infektivität von doppelsträngigen rekombinanten Vektor-DNAs, die verschiedene PSTV-Inserts enthalten.

Test Nr.	Doppelsträngige DNA Vektor-Typ	PSTV-Insert	Orientierung der Insertion	Weiter-behandlung	µg DNA pro Pflanze bei Verdünnung 10^0	Infektiositätsindex [a] bei Verdünnung 10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1.	pBR322	1 x BamH I	+	keine	45	1	0	-	-
2.	pBR322	1 x BamH I		BamH I	15	8	-	-	-
3.	pBR322	2 x BamH I	--	keine	48	10	9	0	0
4.	pBR322	2 x BamH I	--	RNase	48	10	7	-	-
5.	pBR322	2 x BamH I	--	DNase	48	0	-	-	-
6.	pBR322	keines		keine	48	0	-	-	-
7.	M13mp11	1 x BamH I	+	keine	34	4	-	-	-
8.	M13mp11	1 x BamH I	-	keine	34	1	-	-	-
9.	M13mp11	4 x BamH I	++++	keine	68	10	10	3	1
10.	keiner	4 x BamH I[b]	(++++)	Nuclease S1	3	10	10	7	3
11.	M13mp8	1 x Ava II	+	keine	68	1	0	-	-
12.	M13mp8	1 x Ava II		Ava II	17	9	7	-	-
13.	keiner	1 x Ava II		RNase	2.4	10	6	-	-
14.	M13mp8	3 x Ava II	+++	keine	68	10	10	10	1
15.	M13mp8	keines		keine	68	0	-	-	-

[a] Gesamtzahl der Testplanzen, die Symptome entwickeln und PSTV enthalten, ausgehend von 10 Blatt-inokulierten Tomatenpflanzen; -: nicht getestet.

[b] Dieses Fragment wurde durch einen Hind III/EcoRI Mischverdau erhalten aus M13mp11 Klon (Nr. 9) der 4 BamHI-Einheiten der PSTV-DNA enthält.

5.3.2 Infektiositätstests von doppelsträngigen subgenomischen PSTV-DNA-Fragmenten

Die im vorangegangenen Kapitel erwähnte hohe spezifische Infektiosität der linearen monomeren PSTV-DNA-Einheiten, die aus ihrer Vektor-DNA herausgeschnitten wurden, konnte darauf beruhen, daß die DNA-Monomeren nach ihrer Inokulation intrazellulär zu monomeren Ringmolekülen oder zu oligomeren Molekülen ligiert werden könnten. Um zu überprüfen, ob eine solche DNA-Ligation in vivo tatsächlich ablaufen kann, wurde ein spezielles Infektiositätsexperiment durchgeführt. Hierzu wurden zwei AvaI-PSTV-DNA-Fragmente inokuliert, welche nach einer möglichen Ligation in vivo im Prinzip exakt eine PSTV-DNA mit einer Genomlänge bilden können, die dann noch weiter zu oligomerer DNA verknüpft werden kann.

Es wurde darauf verzichtet, die beiden AvaI-Subfragmente aus einem Klon mit einer oligomeren PSTV-DNA zu gewinnen, da hier die Gefahr bestanden hätte, daß möglicherweise durch einen unvollständigen Restriktionsverdau unbeabsichtigterweise auch vollständige PSTV-DNA-Einheiten mit inokuliert hätten werden können. Statt dessen wurden die beiden AvaI-Fragmente aus Plasmiden gewonnen, bei denen nur ein Teil des PSTV-Genomes insertiert war und die somit nur eines der beiden AvaI-PSTV-DNA-Fragmente enthielten. Für diesen Zweck kamen die Plasmide C und D in Frage, die das "große" 192 bp lange AvaI-Fragment von Nukleotid 93-284, bzw das "kleine" 167 bp lange AvaI-Fragment von Nukleotid 285-(359/1)92 enthalten (Tabler, 1983). Beide Fragmente wurden nach präparativem AvaI-Verdau durch Chromatographie über Sephacryl S1000 gereinigt und sowohl jedes für sich allein, als auch zusammen inokuliert.

Der Biotest (Tabelle 3) zeigte, daß die beiden getrennt inokulierten AvaI-Fragmente, wie erwartet, nicht infektiös waren (Tabelle 3, Nr. 1 und 2). Die gemischte Inokulation der beiden für sich alleine nicht infektiösen DNA-Fragmente führte jedoch in 9 von 20 Fällen zu PSTV-Infektionen (Tabelle 3, Nr. 3).

Tabelle 3: Infektiositätstest von doppelsträngigen, subgenomischen PSTV-DNA-Fragmenten, die getrennt oder in Mischung inokuliert wurden.

Test Nr.	PSTV-DNA Subfragment	Nukleotid-Nummer des (+) Stranges (5' -- 3' Ende)	Länge in Nukleotiden	µg inokulierte DNA pro Pflanze	Infektiositäts-index [a]
1.	kleines AvaI [b]	285-(359/1)-92	167	1	0
2.	großes AvaI [b]	93-284	192	1	0
3.	kleines AvaI [b] + großes AvaI [b]	285-(359/1)-92 + 93-284	167 + 192	1 + 1	9

a Gesamtzahl der Testpflanzen, die Symptome entwickeln und PSTV enthalten, ausgehend von 20 Blatt-inokulierten Tomatenpflanzen.

b Die PSTV-DNA mit ihren 359 Nukleotiden besitzt zwei AvaI-Schnittstellen bei Position 92/93 und 284/285 auf der zirkulären Restriktionsschnittkarte, so daß zwei unterschiedlich große subgenomische AvaI-Fragmente erhalten werden können.

5.3.3 Infektiositätstests mit einzelsträngiger PSTV-DNA

Nachdem feststand, daß doppelsträngige PSTV-DNAs in der Lage sind, PSTV-Infektionen hervorzurufen, wurden auch einzelsträngige PSTV-DNAs von (+) und (-) Polarität auf ihre Infektiosität hin getestet. Die Ergebnisse dieser Biotests sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Es zeigte sich hier, daß alle dimeren und höher oligomeren Formen von einzelsträngiger PSTV-DNA infektiös sind, unabhängig ob sie (+) oder (-) Polarität besitzen (Tabelle 4, Nr.3-5,9,12 und 13). Um sicherzustellen, daß die beobachteten Infektionen auch wirklich durch die inokulierte einzelsträngige PSTV-DNA verursacht wurden und nicht etwa durch eventuell vorhandene Kontaminationen mit RNA oder doppelsträngiger DNA, wurden einige einzelsträngige DNA-Proben vor ihrer Inokulation mit verschiedenen Nukleasen behandelt. Der Verdau mit RNase hatte, wie erwartet, keinen Effekt auf die spezifische Infektiosität (Tabelle 4, Nr. 5,6 und 9,10) und bestätigte, daß das infektiöse Agens tatsächlich eine DNA war. Dementsprechend verloren die einzelsträngigen DNAs nach Behandlung mit DNase ihre Infektiosität (Tabelle 4, Nr.7). Da auch nach dem Verdau mit der Einzelstrang-spezifischen Nuklease S1 keine Infektionen mehr beobachtet werden konnten, war schlüssig bewiesen, daß einzelsträngige PSTV-DNAs tatsächlich in der Lage sind, bei der inokulierten Pflanze eine Viroid-Infektion hervorzurufen.

Bei den monomeren einzelsträngigen PSTV-DNAs führte die Inokulation mit der AvaII-Einheit von (+) Polarität zu lediglich einer einzigen Infektion bei 10 inokulierten Pflanzen (Tabelle 4, Nr. 11), während die monomere BamHI-Einheit von (-) Polarität keinerlei Infektion induzierte (Tabelle 4, Nr. 2). Im Gegensatz dazu war die monomere einzelsträngige DNA von (+) Polarität infektiös, allerdings nur in sehr hohen Konzentrationen.
Die Kontrollinfektionen mit einzelsträngiger Vektor-DNA führten, wie erwartet, nicht zu Infektionen (Tabelle 4, Nr. 14-16).

Tabelle 4: **Infektiosität von einzelsträngigen rekombinanten M13-DNAs, die verschiedene PSTV-Inserts enthalten.**

Test Nr.	Einzelsträngige DNA M13-Vektor Typ	PSTV-Insert	Polarität [a]	Weiterbehandlung	µg DNA pro Pflanze bei Verdünnung	Infektiositätsindex [b] bei Verdünnung 10^0	10^{-1}	10^{-2}
1.	mp11	1 x BamH I	+	keine	272	8	-	-
2.	mp11	1 x BamH I	-	keine	133	0	-	-
3.	mp11	2 x BamH I	+	keine	272	10	9	0
4.	mp10	2 x BamH I	-	keine	7	5	1	0
5.	mp11	4 x BamH I	+	keine	62	10	8	0
6.	mp11	4 x BamH I	+	RNase	62	10	9	-
7.	mp11	4 x BamH I	+	DNase	62	0	-	-
8.	mp11	4 x BamH I	+	Nuclease S1	62	0	-	-
9.	mp10	4 x BamH I	-	keine	7	9	5	-
10.	mp11	4 x BamH I	-	RNase	7	10	5	-
11.	mp8	1 x Ava II	+	keine	140	1	-	-
12.	mp8	2 x Ava II	+	keine	62	10	7	0
13.	mp8	3 x Ava II	+	keine	7	8	5	0
14.	mp8	keines	-	keine	10	0	-	-
15.	mp10	keines	-	keine	110	0	-	-
16.	mp11	keines	-	keine	10	0	-	-

[a] Die Polarität der in Pflanzen akkumulierenden zirkulären PSTV-RNA wird definitionsgemäß als (+) Polarität bezeichnet.

[b] Gesamtzahl der Testpflanzen, die Symptome entwickeln und PSTV enthalten, ausgehend von 10 Blatt-inokulierten Tomatenpflanzen; - nicht getestet.

5.3.4 Induktion der in vivo Synthese von PSTV-RNA nach Inokulation mit PSTV-DNA

Nachdem die Tomatenpflanzen nach der Inokulation mit verschiedenen PSTV-DNAs die typischen PSTV-Krankheitssymptome entwickelt hatten, galt es festzustellen, ob diese auch die normale PSTV-RNA enthalten oder ob sich die inokulierte PSTV-DNA als solche replizieren würde. Aus diesem Grunde wurde aus jedem Testansatz mit einer bestimmten PSTV-DNA eine Pflanze mit PSTV-Symptomen, sofern vorhanden, ausgewählt und aus deren jungem Blattgewebe die Gesamtnukleinsäuren extrahiert. Die Nukleinsäureextrakte wurden auf "Northern Blots" analysiert. Als Hybridisierungssonde wurde eine ^{32}P-markierte M13 (-) DNA unter Bedingungen eingesetzt, bei denen sie nur PSTV (+) Sequenzen erkennt. In Extrakten von Symptom-tragenden Pflanzen konnte das für normale PSTV-Infektionen typische RNA-Hybridisierungsmuster nachgewiesen werden. Dabei war es gleichgültig, ob die Nukleinsäuren aus Pflanzen gewonnen wurden, die mit klonierter PSTV-DNA oder mit natürlicher PSTV-RNA inokuliert worden waren (Abb. 13). In beiden Fällen war stets eine starke Bande von zirkulärer PSTV-RNA zu sehen, die wie üblich von einer schwächeren Bande der linearen PSTV-RNA begleitet war.

Um weiter sicherzustellen, daß die inokulierte PSTV-DNA nicht alleine replikationsfähig ist, wurden die Blattextrakte zudem in einer weiteren Hybridisierung im Tüpfeltest ("Dot Blotting") analysiert. Dabei wurden die Proben zum einen unbehandelt aufgetropft, zum anderen vorher mit Alkali behandelt, wobei die vorhandene DNA zu Einzelsträngen denaturiert wird, und gleichzeitig die RNA völlig degradiert wird. Zur Kontrolle wurde die DNA von Plasmid pMT40 in gleicher Weise behandelt. Abbildung 14 zeigt, daß, im Gegensatz zu der PSTV DNA-Kontrolle, die Nukleinsäureextrakte aus Blattgewebe nach Alkali-Behandlung kein Hybridisierungssignal mehr ergeben. Daher muß man annehmen, daß in den Blattextrakten lediglich PSTV-RNAs, aber keine PSTV-DNAs vorhanden sind. Folglich werden die inokulierten PSTV-DNAs in den Viroid-infizierten Pflanzen nicht selbst repliziert, sondern sie lösen eine PSTV-Infektion in der Weise aus, daß sie offenbar in vivo in PSTV (+) oder (-) RNA transkribiert werden, die dann den eigentlichen Prozeß der Viroidreplikation und Infektion in Gang setzt. Schließlich kommt es somit zu einer "normalen" Viroidinfektion mit den typischen Symptomen der Pflanze.

In diesem Zusammenhang sei besonders darauf hingewiesen, daß die verschiedenen Formen von PSTV-DNA, die nach mechanischer Inokulation PSTV-Infektionen auslösen, in strengem Sinne nicht als "infektiös" bezeichnet werden können, sofern man fordert, daß ein Agens nur dann wirklich infektiös ist, wenn es seine eigene Reproduktion auslöst. Die PSTV-DNA aber induziert lediglich die Bildung der eigentlich infektiösen PSTV-RNA, welche in der Folge auch repliziert wird. Wenn man dennoch von einer "infektiösen" PSTV-DNA spricht, so sollte man sich bewußt sein, daß sie nach mechanischer Inokulation lediglich die PSTV-Infektion in Gang setzt.

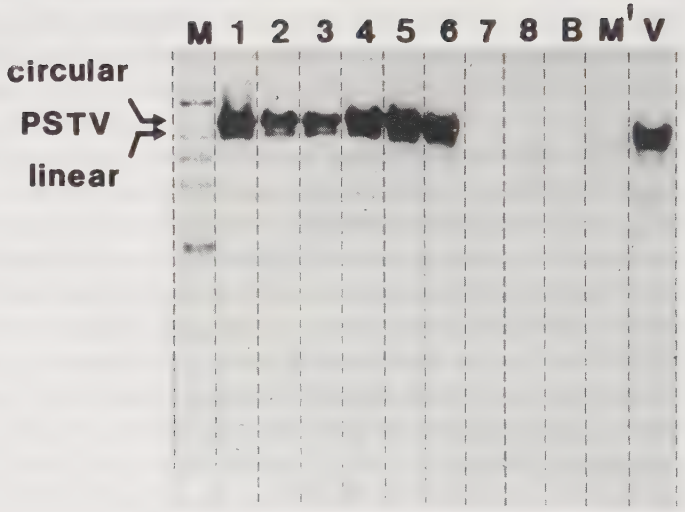

M 1 2 3 4 5 6 7 8 B M' V
circular
PSTV
linear

Abbildung 13: "Northern-Blot" -Analyse von Gesamtnukleinsäure-Extrakten aus Tomatenpflanzen, die mit PSTV-spezifischen Einzelstrang-DNAs von (+) bzw. (-) Polarität inokuliert wurden.

Die mit Phenol extrahierten Nukleinsäuren wurden glyoxaliert und auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Elektrotransfer auf eine Gene Screen Membran erfolgte die Hybridisierung mit ^{32}P-markierter DNA, die ausgehend von Einzelstrang-DNA des Klones M13-42(+) hergestellt wurde und die somit zum Nachweis von PSTV (+) Sequenzen geeignet ist. Es wurden Nukleinsäure-Extrakte aus Pflanzen mit PSTV-Symptomen (S) und solchen ohne PSTV-Symptome (OS) aufgetragen. Die Extrakte wurden im einzelnen aus Tomatenpflanzen gewonnen, die mit folgenden PSTV-spezifischen Einzelstrang-DNAs von (+) und (-) Polarität inokuliert worden waren, :

Spur 1, M13-42(+), 4 BamHI (+) Einheiten (S);
Spur 2, M13-41(+), 2 BamHI (+) Einheiten (S);
Spur 3, M13-A2(+), 2 AvaII (+) Einheiten (S);
Spur 4, M13-A3(+), 3 AvaII (+) Einheiten (S);
Spur 5, M13-42(-), 4 BamHI (-) Einheiten (S);
Spur 6, M13-41(-), 2 BamHI (-) Einheiten (S);
Spur 7, M13mp10 (OS);
Spur 8, M13mp11 (OS);
Spur B, Inokulation mit Puffer (OS);
Spur V, Inokulation mit PSTV-RNA (S);
Spur M, Längenmarker: ^{32}P-markierte HinfI-Fragmente von pBR322
Spur M' Längenmarker: ^{125}J-markierte PSTV-RNA;

Im Vergleich zur Inokulation mit PSTV-RNA (Spur V) zeigen die Nukleinsäure-Extrakte aller Symptom-tragenden Pflanzen (Spur 1-6) ein identisches Hybridisierungssignal, welches durch die Anwesenheit von zirkulärer und linearer PSTV-RNA verursacht wird. Dies zeigt, daß die in M13-klonierte einzelsträngige PSTV-DNA, unabhängig von ihrer Art, Größe und Polarität in der Lage ist, die PSTV-Replikation und die typischen PSTV-Symptome auszulösen.

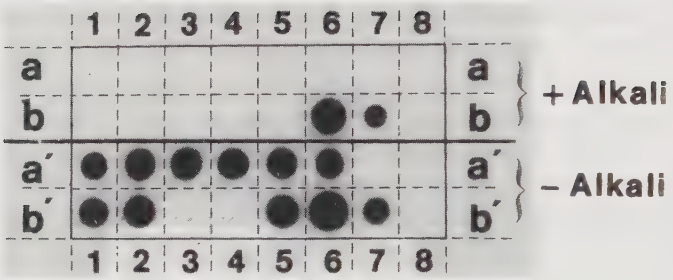


Abbildung 14: Tüpfeltest Analyse zum Nachweis von PSTV-DNA in Gesamtnukleinsäure Extrakten aus Tomatenpflanzen.

Die Pflanzen waren mit verschiedenen einzelsträngigen (Reihe a und a') oder doppelsträngigen (Reihe b und b') PSTV-spezifischen DNAs inokuliert worden. Es wurde jeweils eine mit Alkali behandelte Fraktion von Gesamtnukleinsäure (Reihe a und b), welche dem Nukleinsäuregehalt von ca 10 mg frischem Blattmaterial entspricht, sowie eine entsprechende unbehandelte Fraktion der gleichen Präparation (Reihe a' und b') glyoxaliert und in entsprechenden Positionen auf ein Gene Screen Filter gegeben. Es erfolgte Hybridisierung mit einer ^{32}P-markierten M13-DNA-Probe (M13-42(+) unter Bedingungen, welche für PSTV-Sequenzen spezifisch sind.

Es wurden Nukleinsäureextrakte analysiert, die aus Tomatenpflanzen gewonnen wurden, die entweder Symptome zeigten (S) oder nicht (OS) und welche mit folgenden PSTV-spezifischen DNAs inokuliert worden waren :

Reihen a und a' :

Felder 1, M13-42(+), ssDNA, 4 BamHI (+) Einheiten (S);
Felder 2, M13-41(+), ssDNA, 2 BamHI (+) Einheiten (S);
Felder 3, M13-A2(+), ssDNA, 2 AvaII (+) Einheiten (S);
Felder 4, M13-A3(+), ssDNA, 3 AvaII (+) Einheiten (S);
Felder 5, M13-42(-), ssDNA, 4 BamHI (-) Einheiten (S);
Felder 6, M13-41(-), ssDNA, 2 BamHI (-) Einheiten (S);
Felder 7, M13mp10 ssDNA, (NS);
Felder 8, M13mp11 ssDNA, (NS);

Reihen b und b' :

Felder 1, M13-42(+), ds DNA, 4 BamHI-Einheiten (S);
Felder 2, pMT41 ds DNA, 2 BamHI-Einheiten (S);
Felder 3, pMT40 ds DNA, 1 BamHI-Einheit (OS);
Felder 4, Inokulation mit Puffer (OS);
Felder 5, Inokulation mit PSTV-RNA (S);
Felder 6-8, Anstelle von Extrakt wurden 500, 15, bzw 0,5 ng von gereinigter DNA des Plasmides pMT40 in gleicher Weise auf das Filter gegeben.

Die unbehandelten Nukleinsäure-Extrakte aller Symptom-tragenden Pflanzen gaben ein starkes Hybridisierungssignal welches nach Degradation der RNA durch Behandlung mit Alkali vollständig verschwand. Das Hybridisierungssignal der zur Kontrolle aufgegebenen gereinigten Plasmid-DNA wurde allerdings durch die Alkali-Behandlung nicht beeinflußt. Dieses Resultat zeigt, daß nach Inokulation mit verschiedenen PSTV-spezifischen DNAs in den Symptome bildenden Tomatenpflanzen ausschließlich PSTV-RNA und keine PSTV-DNA nachzuweisen ist. Folglich induziert die inokulierte PSTV-DNA die in vivo Bildung von PSTV-RNA.

5.4 Infektiositätsstudien mit RNA-Transkripten von klonierten DNAs des PSTV-Isolates KF440-2

Nachdem sich die verschiedensten klonierten Formen von PSTV-DNA als infektiös erwiesen hatten, sollten sie auch zur in vitro Synthese der entsprechenden PSTV-RNAs eingesetzt werden und diese sollten dann ebenfalls auf ihre Infektiosität hin überprüft werden.

5.4.1 Infektionstests mit RNA aus Escherichia coli

Die E.coli-Zellen, die einen rekombinanten Vektor mit PSTV-Sequenzen beherbergen, könnten möglicherweise auch in der Lage sein, ihre "Passagier"-DNA in PSTV-RNA zu transkribieren. Aus diesem Grunde wurde die Gesamt-RNA von einer Anzucht eines E.coli-Klones gewonnen, der das Plasmid pMT42 enthielt. Das Plasmid pMT42 enthält vier Kopf-Schwanz-verknüpfte BamHI-PSTV-DNA-Einheiten, die in (+) Orientierung in pBR322 einkloniert sind. Folglich liegt die PSTV-DNA stromabwärts von dem Promotor für das Tetracyclin Resistenz-Gen des Vektors. Wird dieser Promotor in vivo abgelesen, so sollten PSTV (+) RNAs synthetisiert werden. Sollte die PSTV-RNA in vivo nicht sofort wieder abgebaut werden, so müßte eine Gesamt-RNA-Probe ebenfalls infektös sein. Die Gesamt-RNA, die bei der Präparation des Plasmides pMT42 gewonnen wurde, erwies sich tatsächlich als hoch infektiös (Tabelle 5, Nr. 1). Die vorhergehende Behandlung mit DNase hatte keinen Effekt, während der Verdau mit RNase zu einem kompletten Verlust der Infektionsfähigkeit führte (Tabelle 5, Nr.2 und 3). Diese Ergenisse bestätigten, daß die durch Gesamt-RNA aus E.coli induzierte PSTV-Infektion durch eine RNA und nicht durch eine DNA ausgelöst wurde. Parallel dazu erwies sich auch ein Gesamt-Nukleinsäureextrakt, der aus der gleichen E.coli-Kultur gewonnen wurde, als hoch infektiös (Tabelle 5, Nr. 4), wobei das Äquivalent zu 0,2ml Kulturflüssigkeit ausreichend war, um PSTV-Infektionen hervorzurufen.

Tabelle 5: **Infektiosität von Nukleinsäureextrakten aus einer E.coli-Kultur, die einen rekombinanten pBR322-Vektor mit vier (+)orientierten, Kopf-Schwanz-verknüpften BamHI-PSTV-DNA-Einheiten enthält.**

Test Nr.	Art der Nukleinsäure	Weiterbehandlung	Inokulierte Menge pro Pflanze bei Verdünnung 10^0	Infektivitätsindex [a] bei Verdünnung 10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1.	Gesamt-RNA[b]	keine	150 µg	10	10	10	7
2.	Gesamt-RNA[b]	DNase	150 µg	10	10	10	6
3.	Gesamt-RNA[b]	RNase	150 µg	0	-	-	-
4.	Gesamt-Nukleinsäure[c]	keine	ca. 100 µg[d]	10	10	1	-

a Gesamtanzahl der Testpflanzen, die Symptome entwickeln und PSTV enthalten, ausgehend von 10 Blatt-inokulierten Tomatenpflanzen; - nicht getestet.

b Der RNA-Anteil der Nukleinsäure Präparation wurde bei der Plasmid-Aufreinigung von der Plasmid-DNA durch Chromatographie auf Sephacryl S 1000 abgetrennt.

c Die Gesamt-Nukleinsäuren wurden aus einer stationären E.coli-Kultur mit Hilfe von Phenol extrahiert und nach Äthanol-Präzipitation gelöst und inokuliert.

d Äquivalent von 2ml stationärer Kultur.

5.4.2 Infektionstests mit monomeren und oligomeren SP6-RNA-Transkripten von PSTV-DNA

Bei den Infektiositätsstudien mit unterschiedlich langen, durch SP6-Transkription hergestellte PSTV-RNAs von beiderlei Polarität stellte sich heraus, daß mit Ausnahme der monomeren (+) RNA von Klon pSP-A1(-) (Tabelle 6, Nr. 1) alle übrigen oligomeren (+) RNAs hoch infektiös waren (Tabelle 6, Nr. 2-4). Es wurden lediglich etwa 1 ng der oligomeren PSTV (+) RNAs pro Pflanze benötigt, um bei allen 10 Testpflanzen eine Infektion hervorzurufen. Dies entspricht der Menge, die nötig ist, um mit gereinigter PSTV-RNA Infektionen zu erzeugen. Folglich besitzen die synthetisch hergestellten oligomeren PSTV-RNA-Transkripte die gleiche spezifische Infektiosität wie das monomere zirkuläre PSTV-RNA-Molekül selbst.

Die hohe spezifische Infektiosität der oligomeren PSTV (+) RNAs wird durch die Zugabe von oligomerer PSTV (-) RNA weder stimuliert noch reduziert (Tabelle 6, Nr. 5).

Überraschenderweise entwickelte keine der Tomatenpflanzen PSTV-Symptome, die mit oligomeren PSTV (-) RNAs in einer Menge bis zu 1 ug pro Pflanze inokuliert wurden (Tabelle 6, Nr. 6-9). Eine genaue Analyse der Blattextrakte dieser Pflanzen auf einem "Northern Blot" ergab, daß dementsprechend in diesen Pflanzen auch keine PSTV (+) oder (-) Sequenzen vorhanden waren und daß die Pflanzen somit tatsächlich nicht mit PSTV infiziert waren. Erst bei Inokulationen mit 10 ug pro Pflanze konnten einige Infektionen beobachtet werden (Tabelle 6, Nr.9).

Um sicher zu gehen, daß die fehlende bzw geringe spezifische Infektiosität der PSTV (-) RNAs nicht etwa auf eine eventuell inkorrekte Klonierung oder Mutation der entsprechenden PSTV-DNA-Matrizen zurückzuführen war, wurden einige der dazugehörigen Plasmid-DNAs als Kontrolle inokuliert (Tabelle 6, Nr. 11-14). Dabei ergab sich, daß zwar die monomere DNA von Klon pSP-A1(+) nicht und die des Klones pSP-Av1.2(+) mit 1,2 PSTV-DNA-Einheiten nur schach infektiös war. Das längere Plasmid pSP-Av1.8(-), sowie das dimere Plasmid pSP-Av2.2(+) hingegen waren von hoher spezifischer Infektiosität, wie es auch anhand der Ergebnisse mit den übrigen Plasmid- oder M13-klonierten

Tabelle 6: **Infektiosität von monomeren und oligomeren PSTV-RNAs von (+) und (-) Polarität, die in vitro mit SP6-RNA-Polymerase synthetisiert wurden im Vergleich zur Infektiosität der entsprechenden DNA-Matritzen.**

Test Nr.	Plasmid-DNA die als Matritze dient[a]	Eigenschaften des RNA-Transkripts: Länge in Einheitslänge	Polarität	µg RNA (oder DNA) pro Pflanze bei Verdünnung 10^0	Infektiositätsindex[b] bei Verdünnung 10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1	pSP-Al(-)	1.0	+	1	0	0	-	-	-
2	pSP-Av 1.8(-)	1.8	+	1	10	9	10	10	-
3	pSP-Av 2.8(-)	2.8	+	1	10	10	10	10	-
4	pSP-Av 5.8(-)	5.8	+	1	10	10	10	10	1
5	pSP-Av 5.8(-)[c]	5.8	+	1[c]	10	10	10	10	0
6	pSP-Al(+)	1.0	-	1	0	0	-	-	-
7	pSP-Av 1.2(+)	1.2	-	1	0	0	-	-	-
8	pSP-Av 2.2(+)	2.2	-	1	0	0	-	-	-
9	pSP-Av 6.2(+)	6.2	-	10	7	0	0	-	-
10	pSP-Av 6.2(+)	6.2 "capped"[d]	-	1	2	-	-	-	-
11	pSP-Al(+)	(PSTV-DNA-Matritze als Kontrolle)		(48)	0	-	-	-	-
12	pSP-Av 1.2(+)	(PSTV-DNA-Matritze als Kontrolle)		(48)	5	-	-	-	-
13	pSP-Av 1.8(-)	(PSTV-DNA-Matritze als Kontrolle)		(24)	10	10	10	-	-
14	pSP-Av 2.2(+)	(PSTV-DNA-Matritze als Kontrolle)		(24)	10	10	7	-	-

a Die Plasmide enthalten die PSTV-DNA stromabwärts des SP6-Promotors und wurden mit EcoRI geschnitten, um "run-off-Transkription zu ermöglichen. Die (+) und (-) Zeichen geben die Orientierung der Insertion an.

b Gesamtzahl der Testpflanzen, die Symptome entwickeln und PSTV enthalten, ausgehend von 10 Blatt-inokulierten Tomatenpflanzen; - nicht getestet.

c In diesem Test wurden die 5.8(+) RNA-Transkripte mit je 1µg pro Pflanze der 6.2(-)RNA in jeder der fünf Verdünnungen gemischt, um mögliche Einflüsse der PSTV(-)RNA auf die Infektiosität der PSTV(+)RNA zu untersuchen.

d Das "Capping" der 5'Enden der RNA wurde durch Zugabe von GpppG in die Transkriptionsreaktion erreicht, wie unter Material und Methoden beschrieben.

infektiösen oligomeren DNAs zu erwarten war. Es sollte in diesem Zusammenhang besonders darauf hingewiesen werden, daß zB die DNA des Plasmides pSP-Av2.2(+) bereits in Konzentrationen von wenigen hundert Nanogramm Infektionen auslöst (Tabelle 6, Nr.14), während die davon abgeleitete SP6-RNA in Mengen von 1 ug Transkript nicht infektiös ist und dies, obwohl sie, im Gegensatz zu der Plasmid-DNA, fast ausschließlich aus PSTV-Sequenzen besteht.

Einer der möglichen Gründe für die zumindest sehr stark reduzierte Infektiosität der oligomeren PSTV (-) RNAs könnte ihre vergleichsweise geringere Stabilität sein, so daß sie nach der mechanischen Inokulation sehr schnell degradiert werden. Aus diesem Grunde wurde eine oligomere PSTV (-) RNA synthetisiert, die an ihrem 5'-Ende eine "Cap"-Struktur besaß, welche sie vor Exonukleasen schützen sollte. Die Inokulation dieser RNA führte tatsächlich zu zwei Infektionen bei bereits 1 ug Inokulum pro Pflanze (Tabelle 6, Nr. 10). Es bleibt allerdings fraglich, ob dieser Effekt wirklich signifikant ist.

Ein anderer Weg die PSTV (-) RNA während des Inokulationsvorganges vor enzymatischem Abbau zu schützen, sollte durch Mischung mit PSTV (+) RNAs versucht werden. Auf diese Weise sollten stabile und Nuklease-resistentere Hybride gebildet werden. Natürlich kommen für ein solches Experiment nur solche PSTV (+) RNAs in Frage, die selbst nicht infektiös sind. Aus diesem Grunde wurden kurze, subgenomische und somit nicht-infektiöse PSTV (+) RNAs verwendet. Sie konnten dadurch gewonnen werden, daß die DNA-Matrize von den monomeren PSTV-Klonen pSP-Ba(-) bzw pSP-Al(-) mit geeigneten Restriktionsenzymen innerhalb der PSTV-DNA geschnitten wurden. Bei der sich anschließenden SP6- "run-off"-Transkription enteht dann eine PSTV (+) RNA, die am 3'-Ende PSTV-Sequenzen aber keine Vektorsequenzen besitzt. Die verschiedenen subgenomischen PSTV (+) RNAs wurden mit der oligomeren PSTV (-) RNA mit einer Länge von 6,2 PSTV-Einheiten entweder in einfacher Mischung inokuliert oder nachdem die beiden RNAs vorher aneinander hybridisiert worden waren.

Die Infektionsexperimente zeigten, daß tatsächlich einige Mischungen zweier an sich nicht infektiöser RNAs zu Infektionen führen konnten (Tabelle 7), wobei die beobachtete Infektiosität jedoch in keiner vorhersehbaren Weise mit der Art und der Länge der benutzten

Tabelle 7: **Effekt von verschiedenen nicht-infektiösen subgenomischen PSTV(+)RNA-Fragmenten auf die Infektiosität der concatemeren PSTV-RNAs von (-) Polarität und 6.2 facher Länge [a].**

Test Nr.	DNA Matritze von welcher die PSTV(+) RNA transkribiert wurde[b]	Start and Ende des PSTV (+) RNA Fragmentes[c] 5' ——— 3'	Länge des PSTV (+) RNA Fragmentes (Anzahl der Nukleotide)	Menge der PSTV RNAs in der Inokulationsmischung µg(+)RNA pro Pflanze	µg(-)RNA pro Pflanze	Infektivitätsindex [d] unbehandelte Mischung[e]	hybridisierte Mischung[f]
1	pSP-Ba(-) x XmaIII	87-148	62	0.08	0.24	0	-
2	pSP-Ba(-) x XmaIII	87-148	62	0.12	0.4	1	0
3	pSP-Ba(-) x AvaII	87-223	137	0.12	0.4	1	2
4	pSP-Al(-) x BamHI	282-(359/1)-91	169	0.08	0.24	1	-
5	pSP-Al(-) x BamHI	282-(359/1)-91	169	0.17	0.4	2	2
6	pSP-Al(-) x SmaI	282-(359/1)-94	172	0.08	0.24	0	-
7	pSP-Al(-) x SmaI	282-(359/1)-94	172	0.17	0.4	0	0
8	pSP-Al(-) x XmaIII	282-(359/1)-148	226	0.08	0.24	0	-
9	pSP-Al(-) x XmaIII	282-(359/1)-148	226	0.22	0.4	1	1
10	pSP-Al(-) x AvaII	282-(359/1)-223	301	0.08	0.24	1	-
11	pSP-Al(-) x AvaII	282-(359/1)-223	301	0.4	0.4	0	1
12	pSP-Al(-) x Sal I	282-(359/1)-281	359	0.08	0.24	1	-
13	pSP-Al(-) x Sal I	282-(359/1)-281	359	0.38	0.4	-	1
14	pSP-Al(-) x Sal I	282-(359/1)-281	359	0.19	0.4	-	2
15	(-) RNA Kontrolle	-	-	-	0.24	0	0
16	(-) RNA Kontrolle	-	-	-	0.4	0	0

a Die PSTV (-) RNA wurde ausgehend von der linearisierten Matritzen-DNA des Plasmides pSP-Av 6.2(+) synthetisiert.
b Die Plasmid-DNAs, die als Matritzen dienten, wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten, um eine "run-off" Transkription innerhalb der PSTV-Sequenz zu ermöglichen.
c Das 5' Ende aller dieser PSTV (+) RNAs enthält ein Vektor-spezifisches RNA-Segment, wie im Text beschrieben. Es besteht aus 47 Nukleotiden, sofern das Transkript aus dem Klon pSP-Al(-) stammt, und aus 69 Nukleotiden, wenn es vom Klon pSP-Ba(-) abgeleitet ist. Mit Ausnahme von Nr. 12-14 sind die 3' Enden frei von Vektor-Sequenzen.
d Gesamt-Anzahl der Testpflanzen, die Symptome entwickeln und PSTV enthalten, ausgehend von sechs Blatt-inokulierten Tomatenpflanzen; -nicht getestet.
e Die zwei RNAs wurden gemischt und ohne weitere Behandlung inokuliert.
f Vor der Inokulation wurden die zwei RNAs hybridisiert, wie unter Material und Methoden beschrieben.

(+) RNA-Fragmente korrelierte. Auch schien es keinen Einfluß zu haben, ob die beiden RNAs einfach gemischt wurden oder ob sie vorher aneinander hybridisiert wurden. Die Ergebnisse dieses Experimentes werden im Diskussionsabschnitt noch eingehender interpretiert.

5.4.3 Infektionstests mit partiell duplizierten SP6-RNA-Transkripten von PSTV-DNA

Der Vergleich verschiedener oligomerer PSTV (+) RNAs im vorangegangenen Abschnitt zeigte, daß die Anzahl der Kopf-Schwanz-verknüpften monomeren PSTV-Einheiten ab einer gewissen Mindestgröße keinen Einfluß mehr auf die spezifische Infektiosität besitzt. Selbst von der PSTV-RNA der 1,8 fachen Länge (die damit gar nicht in vollem Umfange dupliziert ist) benötigt man die gleiche Menge wie von der höher oligomeren RNA mit 5,8 PSTV-Einheiten, um eine Viroidinfektion hervorzurufen. Andererseits bestätigte sich der schon im Falle der doppel- und einzelsträngigen PSTV-DNAs beobachtete Befund, daß monomere Formen gar nicht oder allenfalls nur sehr schwach infektiös sind. Es galt also herauszufinden, um wieviel ein monomeres PSTV-Konstrukt vergrößert werden muß, um schließlich Infektionen in reproduzierbarer Weise zu induzieren, bzw um welche Bereiche man ein dimeres Konstrukt verkleinern kann, ohne daß die Infektionsfähigkeit beeinträchtigt wird. Dieser Test wurde mit entsprechenden SP6-RNAs durchgeführt, da sich die PSTV (+) RNA als das eigentlich infektiöse Agens erwiesen hatte. Um die verschiedenen Konstrukte in ihrer spezifischen Infektiosität besser vergleichen zu können, wurde von nun an nicht nur die Anzahl der infizierten Pflanzen herangezogen, sondern auch der zeitliche Verlauf berücksichtigt, mit dem die getesteten RNAs zu PSTV-Infektionen führten. Da die Tageslänge, die Intensität des Sonnenlichtes, die Temperatur und der außerdem der physiologische Zustand der Tomatenpflanzen Einfluß auf die Schnelligkeit und Intensität der Symptom-Ausprägung haben, können nur RNAs miteinander verglichen werden, die am selben Tag inokuliert wurden.

Infektiosität von PSTV-RNAs mit "langen" duplizierten Bereichen :

Der Klon pSP-Av1.8(-), der eine nur partiell duplizierte, aber dennoch infektiöse SP6-RNA lieferte, diente als Ausgangspunkt zur Konstruktion der Klone der "pAl-Serie", deren Transkripte zwar am 5'-Ende identisch mit denen des Plasmides pSP-Av1.8(-) sind, aber am 3'-Ende verkürzt wurden. Dabei zeigte sich, daß, im Vergleich zu der oligomeren Kontroll-RNA (Tabelle 8a, Nr. 5), die Verkürzung der duplizierten Region bis zu Nukleotid 88 (vergl. Abb. 8) keinen Effekt auf die spezifische Infektiosität hat (Tabelle 8a, Nr. 2-4). Dagegen führte die Verkürzung um weitere 10 Nukleotide bei dem SP6-RNA-Transkript des Klones pAl78 zu einer deutlichen Reduktion in der Geschwindigkeit mit der die Testpflanzen PSTV-Symptome entwickelten (Tabellen 8a, Nr. 1; 8b, Nr. 4).

Nachdem sich die RNA des Klones pAl88 als gleichermaßen infektiös erwiesen hatte wie eine oligomere RNA, sollte eine RNA auf ihre Infektiosität getestet werden, die genau denjenigen Bereich dupliziert besitzt, der dem Transkript von Plasmid pAl88 zum vollen Dimer fehlt (vergl. Abb. 8, Konstrukte D und G). Die diesen Anforderungen entsprechende SP6-RNA von Klon pBa281 war ebenfalls infektiös (Tabellen 8b, Nr.5; 8c, Nr. 5). Die im Vergleich dazu um 15 Nukleotide am 5'-Ende deletierte RNA des Klones pBs281 (Abb. 8, F) hingegen führte wiederum zu einem langsameren Verlauf der Symptomentwicklung (Tabelle 8c, Nr.6).

Infektiosität von PSTV-RNAs mit "kurzen" duplizierten Bereichen :

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß Deletionen im duplizierten Bereich der "oberen zentralen konservierten Region" der PSTV-RNA zu einer Reduktion der spezifischen Infektionsrate führte, wurden Klone konstruiert, die ausschließlich in diesem Bereich Duplikationen besaßen. Der Infektiositätstest mit den SP6-RNA-Transkripten der Klone der pHa-Serie ergab, daß die Duplikation der Nukleotide 83-88 im Transkript des Plasmides pHa88 zu hoher Infektiosität führte (Tabelle 8a, Nr. 6 und jeweils Nr. 1 in Tabellen 8b,d) und daß auch das um 3 Nukleotide längere Transkript des Klones pHa91 ebenfalls stark infektiös war (Tabellen 8a, Nr.7; 8b, Nr. 2).

Tabelle 8a : Infektiositätstest mit partiell duplizierten PSTV (+) SP6-RNAs

Test Nummer	DNA Matrize	Enzym für die Linearisierung	duplizierte PSTV-Region	µg RNA pro Pflanze	Infektionsindex von 10 Pflanze Tage nach der Inokulation :				
					20	26	29	33	48
1.	pAl78	EcoRI	282-(359/1)-78	1.0	0	2	4	6	/
2.	pAl88	EcoRI	282-(359/1)-88	1.0	6	/	/	/	/
3.	pAl91	EcoRI	282-(359/1)-91	1.0	6	/	/	/	/
4.	pAl97	EcoRI	282-(359/1)-97	1.0	6	/	/	/	/
5.	pSP-Av5.8(-)	EcoRI	gesamtes Genom	1.0	6	/	/	/	/
6.	pHa88	EcoRI	83-88	1.0	6	/	/	/	/
7.	pHa91	EcoRI	83-91	1.0	6	/	/	/	/
8.	pHa97	EcoRI	83-97	1.0	0	0	0	0	2
9.	pSP-Ba(-)	EcoRI	87-97	1.0	0	0	0	0	2

Tabelle 8b : Infektiositätstest mit partiell duplizierten PSTV (+) SP6-RNAs

Test Nummer	DNA Matrize	Enzym für die Linearisierung	duplizierte PSTV-Region	ug RNA pro Pflanze	Infektionsindex von 10 Pflanze Tage nach der Inokulation :						
					15	16	18	20	22	25	40
1.	pHa88	EcoRI	83-88	1.0	3	4	6	/	/	/	/
	"	"		0.01	0	0	2	2	4	5	6
2.	pHa91	EcoRI	83-91	1.0	2	3	5	6	/	/	/
3.	pHa97	EcoRI	83-97	1.0	0	0	1	2	2	2	4
4.	pAl78	EcoRI	282-(359/1)-78	1.0	2	3	4	4	5	5	6
5.	pBa281	EcoRI	87-281	1.0	3	5	6	/	/	/	/

Tabelle 8c : Infektiositätstest mit partiell duplizierten PSTV (+) SP6-RNAs

Test Nummer	DNA Matrize	Enzym für die Linearisierung	duplizierte PSTV-Region	µg RNA pro Pflanze	Infektionsindex von 10 Pflanzen Tage nach der Inokulation : 13	14	15	17	20	22	24	28	35	50
1.	pHa97	EcoRI	83-97	0.5	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
2.	pHa97	XcyI*	83-96	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.	pHa97	SmaI*	83-94	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.	pHa106	EcoRI	85-106	0.3	7	7	9	10	/	/	/	/	/	/
	"	"	"	0.01	0	0	1	2	2	2	3	3	4	5
5.	pBa281	EcoRI	87-281	0.3	3	5	7	9	9	10	/	/	/	/
	"	"	"	0.01	0	0	0	1	1	2	2	2	3	3
6.	pBs281	EcoRI	102-281	0.3	0	2	4	4	6	7	7	8	9	9
	"	"	"	0.01	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2

* : Geschnitten an der stromabwärtsgelegenen Erkennungsregion innerhalb der PSTV-Sequenz

Tabelle 8d : Infektiositätstest mit partiell duplizierten PSTV (+) SP6-RNAs

Test Nummer	DNA Matrize	Enzym für die Linearisierung	duplizierte PSTV-Region	µg RNA pro Pflanze	Infektionsindex von 10 Pflanzen Tage nach der Inokulation : 18	19	20	21	24	25	27	31	33	40	60
1.	pHa88	EcoRI	83-88	1.0	0	2	5	5	8	9	10	/	/	/	/
	"	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
2.	pHa97	EcoRI	83-97	1.0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
3.	pSP-Ba(-)	EcoRI	87-97	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.	pBBs106	EcoRI	(87-91) 102-106	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	pBs106	EcoRI	102-106	1.0	0	0	0	0	0	2	3	4	8	10	/
6.	pSP-Bs2(+)	EcoRI	gesamtes Genom*	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : Zwischen den beiden PSTV-RNA-Einheiten befindet sich eine Insertion eines U-Nukleotides

Der Einfluß verschieden duplizierter Regionen der PSTV RNA auf ihre spezifische Infektiosität

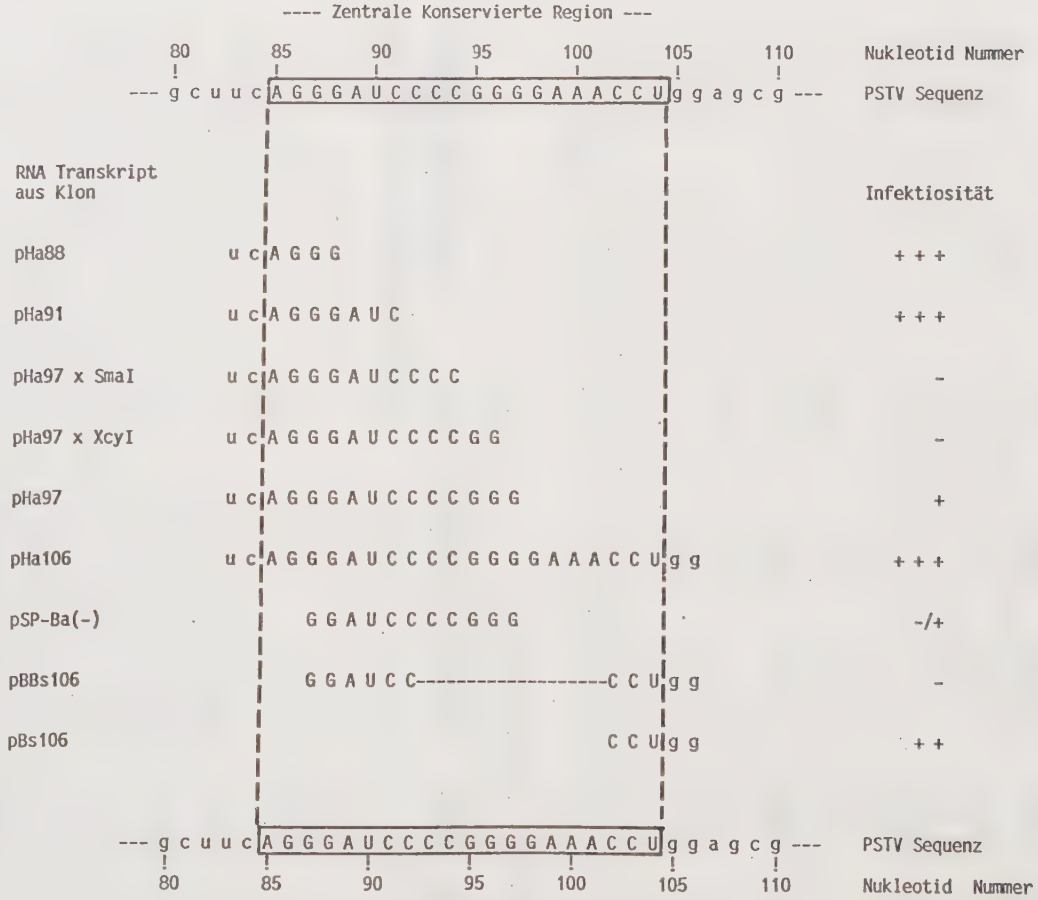


Abbildung 15: Zusammenfassende Darstellung über die spezifischen Infektiositäten von PSTV-RNA-Transkripten, die innerhalb der oberen zentralen konservierten Region dupliziert sind.

Im oberen und im unteren Teil der Abbildung ist die PSTV-Sequenz zwischen den Nukleotiden 80 bis 110 angegeben. Die Nukleotide 85-104, welche der sogenannten "oberen zentralen konservierten Region" angehören, sind in Großbuchstaben wiedergegeben und zusätzlich eingerahmt.

Die duplizierten PSTV-spezifischen Bereiche von SP6-RNA-Transkripten verschiedener Plasmid-Klone sind aufgeführt. Dies bedeutet, daß zB das Transkript des Plasmides pHa97 den Bereich der 15 Nukleotide zwischen Nukleotid 83-97 je einmal am 5'-Ende und am 3'-Ende besitzt. Dazwischen liegen die übrigen - nicht duplizierten - PSTV-Nukleotide. Die DNAs pHa97 x SmaI bzw pHa97 x XcyI wurden durch partiellen Verdau des Plasmides pHa97 hergestellt. In diesem Falle ist die resultierende PSTV-RNA frei von Fremdsequenzen am 3'-Ende. Die Darstellung bei Plasmid pBBs106 bedeutet, daß am 5'-Ende des entsprechenden SP6-RNA-Transkriptes die Nukleotide GGAUCC (87-92) unmittelbar an die Nukleotide CCUGG (102-106) anschließen. Es folgt eine vollständige Genom-Einheit der PSTV-RNA, welche bei Nukleotid 106 am 3'-Ende abschließt. Die rechte Spalte gibt das Infektionsverhalten der entsprechenden RNAs wieder. Die verwendeten Symbole haben folgende Bedeutung :

+++ : alle Testpflanzen entwickeln die PSTV-Krankheitssymptome in etwa der gleichen Zeit wie nach der Inokulation mit einer oligomeren RNA;

++ : alle oder nahezu alle Testpflanzen entwickeln PSTV-Symptome, jedoch erst nach einer längeren Latenzzeit;

\+ : nur einige Testpflanzen entwickeln PSTV-Symptome;

\- : Keine der Testpflanzen entwickelt PSTV-Symptome.

Dagegen führte das Transkript von Klon pHa97, das gegenüber der RNA von Klon pHa88 am 3'-Ende um 9 Nukleotide verlängert ist, entweder nur zu wenigen Infektionen (Tabellen 8a, Nr. 8; 8c, Nr. 1; 8d, Nr. 2) oder zeigte gegenüber den kürzeren RNAs einen zumindest sehr viel langsameren Verlauf (Tabelle 8b, Nr. 3).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Fremdsequenzen am 3'-Ende diese Verminderung der Infektionsfähigkeit der RNA von Klon pHa97 verursachen, wurde durch einen Partialverdau des Plasmides pHa97 mit den Restriktionsenzymen XcyI (welches ein Isoschizomer von XmaI ist) und SmaI eine DNA-Matrize hergestellt, bei der das entstehende SP6-RNA-Transkript keine Fremdsequenzen mehr am 3'-Ende besitzt. Auch hierdurch konnte jedoch keine Steigerung der Infektiosität beobachtet werden (Tabelle 8c, Nr. 1-3).

Die SP6-RNA des Klones pSP-Ba(-), die lediglich am 5'-Ende fünf PSTV-spezifische Nukleotide weniger besitzt als die RNA von Klon pHa97, verhielt sich ebenfalls nur schwach infektiös (Tabelle 8a, Nr. 9) oder nicht infektiös (Tabelle 8d, Nr. 3). Im Gegensatz zu diesen beiden letztgenannten RNAs war die RNA von Klon pHa106, die gegenüber Klon pHa97 am 5'-Ende um zwei PSTV-Nukleotide kürzer und am 3'-Ende um neun Nukleotide länger ist, wiederum hoch infektiös (Tabelle 8c, Nr. 4).

Schließlich wurden noch die SP6-RNAs der Klone pBBs106 und pBs106 auf ihre Infektiosität getestet. Während die RNA von Klon pBBs106 überhaupt keine Infektionen auslösen konnte (Tabelle 8d, Nr. 4), erwies sich die RNA des Plasmides pBs106 überraschenderweise als infektiös. (Tabelle 8d, Nr. 5). Dies ist in sofern erstaunlich, als das Plasmid pBs106 durch Deletion einer BamHI-Schnittstelle aus genau jenem Klon pBBs106 konstruiert worden war, dessen RNA sich als nicht infektiös erwies.

Schließlich führte auch die Insertion eines U-Nukleotides zwischen die Position U_{104} und G_{105} bei Klon pSP-Bs2(+) zu einem Verlust der Infektiosität der PSTV-RNA (Tabelle 8d, Nr. 6).

Die duplizierten Bereiche der erwähnten PSTV (+) RNAs, und die in den entsprechenden Infektiositäts-Tests erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 15 zusammengefaßt.

5.5 Gezielte Mutagenese der PSTV-DNA

Das wesentliche Ziel der Mutagenese des PSTV war es, die daraus resultierenden phänomenologischen Effekte des veränderten PSTV-Moleküles zu analysieren. Gezielte Manipulationen der PSTV-Primärstruktur sind jedoch nur auf der Ebene der DNA möglich. Sollen daher die biologischen Auswirkungen untersucht werden, so muß es prinzipiell möglich sein, mit der klonierten und gegebenenfalls mutierten PSTV-DNA Infektionen auszulösen. Wie die umfangreichen Infektionsstudien gezeigt hatten, erwies es sich dabei am günstigsten, wenn die klonierte PSTV-DNA als Matrize für die in vitro Synthese von SP6-RNA-Transkripten von (+) Polarität eingesetzt wurde. Denn diese RNA ist am besten geeignet, um durch mechanische Inokulation bei Tomatenpflanzen PSTV-Infektionen hervorzurufen. Daher wurde die biologische Aktivität der mutierten PSTV-DNA auch in Form des entsprechenden SP6-RNA Transkriptes von (+) Polarität getestet.

Bei den Überlegungen, welche Bereiche des PSTV-Moleküles mutiert werden sollten mußten die Sequenzanalysen von unterschiedlich virulenten PSTV Isolaten berücksichtigt werden. Dabei hatte sich gezeigt, daß bei verschiedenen PSTV-Varianten nur geringfügige Abweichungen in der Sequenz gefunden wurden, die zudem noch in bestimmten Bereichen des Moleküls auftraten. Die Kettenlänge blieb bei allen Isolaten mit 359 Nukleotiden konstant (Schnölzer et al., 1985). Angesichts dieser Situation war nicht zu erwarten, daß die PSTV-RNA nach größeren Deletionen oder Insertionen sich als infektiös erweisen würde. Schließlich führte bereits die Insertion eines einzelnen Nukleotides, wie im vorangegengenen Kapitel gesehen, zu einem Verlust der Infektivität. Da das PSTV-Molekül sich als relativ konserviert erwiesen hatte, erschien es zweifelhaft, ob sich die mit Hilfe von chemischen Mutagenesemethoden erzeugbaren ungezielten Punktmutationen in der PSTV-DNA als geeignet erweisen würden, die Zusammenhänge zwischen der Struktur des PSTV und seinen biologischen Eigenschaften, wie Infektiosität, Replikabilität und Virulenz zu untersuchen.

Statt dessen sollte die PSTV-DNA ganz gezielt an einigen definierten Stellen mit Hilfe der "Oligonukleotid-gerichteten" Mutagenese ver-

ändert werden. Das Prinzip dieser Technik und die angewendete Strategie werden im folgenden Kapitel kurz erläutert.

5.5.1 Prinzip und Strategie der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese

Die Methode der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese ist ein effizientes und präzises Verfahren, eine klonierte DNA bekannter Sequenz in nahezu beliebiger Weise an einigen Positionen gezielt zu verändern.

Das Prinzip dieser genauesten Methode der Mutagenese beruht darauf, daß ein DNA-Oligonukleotid synthetisiert wird, das nicht exakt, sondern lediglich **nahezu** komplementär zu dem Bereich der zu mutierenden DNA ist. Das Adjektiv "nahezu" deutet bereits an, daß das DNA-Oligonukleotid mindestens eine Fehlstelle ("Mismatch") besitzt, d.h. ein nicht basenpaarendes Nukleotid. Dieser "Mismatch" wird bei der chemischen Synthese des DNA-Oligonukleotides gezielt eingefügt und entspricht der gewünschten Mutation. Zur weiteren Durchführung der Mutagenese ist es nötig, eine einzelsträngige Form der zu mutierenden DNA zu gewinnen, was durch Subklonierung in Einzelstrang-produzierende Vektoren, wie zB dem Bakteriophage M13, leicht möglich ist. Das mutagene Oligonukleotid wird anschließend an die einzelsträngige DNA hybridisiert. Wegen der weitgehenden Komplementarität wird das DNA-Oligonukleotid an die Zielsequenz binden, jedoch im Bereich des "Mismatches" keine Basenpaarungen eingehen. Das kurze gebundene DNA-Oligomer wird dann in der sich anschließenden Reaktion mit Klenow-Enzym als Starter ("Primer") für die DNA-Synthese genutzt, wobei die ursprünglich einzelsträngige DNA in vitro zu einer Duplex-Form ergänzt wird. Schließlich wird der noch vorhandene "Bruch" mit T_4DNA-Ligase geschlossen. Der gewonnene DNA-Doppelstrang besteht aus dem ursprünglich isolierten Einzelstrang, welcher dem "Wildtyp"-Strang entspricht, sowie dem neu synthetisierten mutierten Strang, der das mutagene Oligonukleotid trägt. Nach Transformation bzw Transfektion bestehen hinsichtlich des Schicksals des eingeschleusten DNA-Doppelstranges zwei Möglichkeiten :

(I) Der Mismatch wird von den DNA-Reparaturenzymen der E.coli-Zelle erkannt und beseitigt. Obwohl es abhängig von der Art des

Mismatches durchaus Präferenzen gibt, wie ein bestimmter ungepaarter Bereich repariert wird (Kramer,B. et al., 1984), kann das DNA-Reparatursystem normalerweise zwischen dem ursprünglichen "biologisch" synthetisierten und daher methylierten Wildtyp-DNA-Strang und dem in vitro erzeugten und daher nicht methylierten mutagenen Strang unterscheiden. Aus diesem Grunde entsteht überwiegend Nachkommenschaft der Wildtyp- DNA und nicht die der gewünschten Mutante.

(II) Die beiden DNA-Stränge können bei der DNA-Replikation segregieren. Daher findet man in der transformierten Zelle zunächst gleichzeitig Nachkommenschaft der doppelsträngigen Wildtyp- und der Mutanten-DNA. Im Falle des Bakteriophagen M13 entstehen somit zwei Typen von Phagen, die nach Freisetzung und Re-Infektion von gesunden Wirtszellen zu einheitlichen Klonen führen und sich daher unterscheiden lassen.

Zur Unterscheidung von Mutanten und Wildtyp benutzt man das mutagene DNA-Oligonukleotid nach radioaktiver Markierung als Sonde, denn zu der DNA der Mutante kann es perfekt hybridisieren, während es mit der Wildtyp-DNA einen Mismatch bildet. Unter geeigneten Hybridisierungs- bzw Waschbedingungen ist eine Unterscheidung zwischen Mutante und Wildtyp möglich (Abb. 2). Der endgültige Nachweis, daß die Mutagenese erfolgreich in der gewünschten Weise durchgeführt worden ist, erfolgt durch Sequenzierung.

Obwohl alle gängigen Methoden der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese auf dem oben geschilderten Prinzip beruhen, gibt es doch eine ganze Anzahl von Möglichkeiten, die Ausbeute an Mutanten zu erhöhen (vergl. als Übersicht Carter, 1986).

Bei der Mutagenese von PSTV-DNA wurde die sogenannte "gapped duplex" Methode unter Verwendung der "Amber-Selektion" durchgeführt, die zwar zu den aufwendigsten, dafür aber auch effizientesten Mutagenesemethoden mit Hilfe von DNA-Oligonukleotiden zählt (Kramer,W. et al. 1984). Die Charakteristika und Vorzüge dieser Methode sind unten aufgeführt.

Mutagenese mit Hilfe der "gapped duplex" Methode :

Bei dieser Technik wird zunächst eine doppelsträngige DNA hergestellt, die allerdings in dem Bereich in dem die Mutagenese stattfinden soll eine einzelsträngige "Lücke" aufweist, so daß das mutagene Oligonukleotid leicht und spezifisch binden kann. Eine solche doppelsträngige DNA mit Lücke ("gapped duplex") kann man herstellen, indem man zB die einzelsträngige DNA eines rekombinaten M13-Vektors isoliert, der die zu mutagenisierende DNA als Insert trägt. Gleichzeitig linearisiert man die doppelsträngige DNA eines entsprechenden M13-Vektors, der jedoch keine Fremd-DNA trägt. Die beiden isolierten DNAs werden gemischt, wobei in der Regel die Einzelstrangform im molekularen Überschuß vorliegt. Anschließend wird thermisch denaturiert, wobei sich die DNA-Stränge des Doppelstranges trennen. Bei der folgenden Renaturierung wird sich der aus der linearen Duplex-DNA stammende M13 (-) Strang überwiegend mit dem im Überschuß vorhandenen rekombinanten, zirkulären (+) DNA-Einzelstrang zu einer "gapped duplex" DNA verbinden und nur zu einem geringen Teil mit dem linearen (+) Strang wieder zur ursprünglichen linearen doppelsträngigen Form renaturieren. Die gebildete "gapped duplex" DNA ist doppelsträngig im Bereich der M13-Vektor-Sequenzen und einzelsträngig im Bereich der Sequenzen des einklonierten Inserts. Die "gapped duplex" DNA läßt sich durch Auftrennung im Agarosegel bei Bedarf in reiner Form gewinnen.

Wird für die Renaturierung statt des einfachen M13-Vektors eine in geeigneter Weise linearisierte doppelsträngige DNA des rekombinanten Vektors eingesetzt, so lassen sich natürlich auch Einzelstranglücken innerhalb des DNA-Inserts erzeugen.

Die Herstellung der "gapped duplex" DNA hat drei Vorteile :

(a) Das mutagene DNA-Oligonukleotid findet nur einen limitierten Einzelstrangbereich vor und kann, sofern eine Komplementarität zur M13-DNA vorliegt, daher nur sehr viel schlechter an nicht beabsichtigte Stellen binden.

(b) Lediglich ein relativ kurzer Bereich muß in vitro zu Doppelstrang-DNA ergänzt werden.

(c) Beide Stränge werden in E.coli produziert und sind daher normalerweise auch methyliert. Daher wird der Wildtypstrang nach der Transfektion nicht mehr bevorzugt repariert, so daß die Chance, Mutanten zu finden stark erhöht wird.

Anreicherung der Mutanten durch "Amber-Selektion" :

Die "gapped duplex" Methode der Mutagenese kann weiter verbessert werden, sofern man M13-DNA-Stränge mit unterschiedlichen genetischen "Markern" verwendet, die eine Selektion auf den DNA (-) Strang erlauben. Man erreicht dann, daß vorwiegend die gewünschten mutierten Phagen überleben. Es bietet sich zB an, eine Amber-Mutation in den M13-Vektor einzuführen, welche die zu mutierende Fremd-DNA trägt. Auf einem geeigneten Suppressorstamm ist diese rekombinante DNA replikationsfähig. Die "gapped duplex" wird mit einem (-) M13-DNA-Strang gebildet, der keine Amber-Mutation besitzt. Im Bereich des Amber-Locus wird also auf diese Weise ein zweiter Mismatch erzeugt. Schließlich wird der (-) Strang mit dem mutagenen Oligonukleotid kovalent verknüpft. Bei Vermehrung auf einem Suppressor-negativen Wirtsstamm ist die Nachkommenschaft des (+) Stranges nicht lebensfähig, während der in gewünschter Weise mutierte M13 (-) DNA-Strang Nachkommen erzeugt, die nicht der Selektion unterworfen sind. Alle überlebenden Phagen sollten daher die mutierte DNA tragen.

Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß die Amber-Selektion nicht unmittelbar nach der Transfektion erfolgen kann. Wie bereits erwähnt wurde, segregieren die beiden Stränge während der ersten DNA-Replikation in der Wirtszelle, so daß beide Typen der Nachkommenschaft gemeinsam vorliegen. Da die Amber-Mutante durch den gleichzeitig anwesenden Wildtyp komplementiert wird, ist eine Selektion natürlich zwecklos. Die eigentliche Selektion erfolgt erst nachdem einzelne Phagenpartikel erneut eine Suppressor-negative Wirtszelle infizieren.

Anreicherung der Mutanten durch E.coli "Mutator-Stämme":

Eine weitere Verbesserung der Ausbeute an Mutanten kann erzielt werden, wenn zur Transfektion ein Wirtsstamm verwendet wird, der einen Defekt in einem der DNA-Reparaturgene besitzt, denn damit ist

gewährleistet, daß der künstlich erzeugte "Mismatch" nicht repariert wird. Andererseits erzeugen Wirtstämme mit einem Defekt in den Reparaturgenen gerade wegen dieses Defektes häufig Mutationen an beliebigen Stellen. Solche E.coli-Stämme sind als "Mutatorstämme" bekannt. Um unbeabsichtigte Mutationen in der klonierten DNA zu vermeiden, soll lediglich die Transfektion in einen Mutatorstamm erfolgen, der dann eine Segregation ohne Reparatur ermöglicht. Die eigentliche Vermehrung der gezielt mutierten M13-Phagen erfolgt allerdings in einem Non-Mutatorstamm.

Wenn man nun die Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese mit Hilfe der "gapped duplex" Methode und unter Verwendung von Amber-Selektion sowie der Transfektion in einen Mutator-Stamm durchführt, so sollte man eigentlich ausschließlich Mutanten-Klone erwarten. Die Erfahrung zeigt jedoch, daß man lediglich etwa 50% Mutanten erhält (Kramer,W. et al., 1984).

5.5.2 Durchführung der gerichteten Mutagenese der PSTV-DNA

Es war wünschenswert, eine mutierte PSTV-DNA ohne erneute Subklonierung auf ihre biologische Aktivität testen zu können. Es ist daher günstig, wenn die Ausgangs-DNA, die mutiert werden soll, möglichst stromabwärts von einem SP6-Promoter kloniert ist, so daß davon ein infektiöses (+) RNA-Transkript gewonnen werden kann. Andererseits sind oligomere Konstrukte für die in vitro Mutagenese völlig ungeeignet, da hier das mutagene DNA-Oligonukleotid mehrmals binden kann. Weiterhin sollte möglichst eine einzelsträngige DNA von (+) Polarität eingesetzt werden. Das eingesetzte mutagene DNA-Oligonukleotid besitzt dann (-) Polarität und kann deshalb nicht nur zur eigentlichen Mutagenese eingesetzt werden, sondern kann prinzipiell auch als Sonde für (+) RNA von resultierenden PSTV-Mutanten verwendet werden.

Aus den genannten Gründen wurde der Klon pHa88 als Ausgangs-DNA ausgewählt, da er ein hoch-infektiöses SP6-Transkript von der einklonierten PSTV-DNA liefert, die bis auf sechs Nukleotide nicht dupliziert ist. Selbst diese 6 Nukleotide können gezielt mutiert werden, da es wegen der unterschiedlichen Randsequenzen möglich ist, auch

hierfür spezifische mutagene DNA-Oligonukleotide zu synthetisieren.

Das EcoRI-HindIII-Fragment aus Plasmid pHa88, das neben der PSTV-DNA den SP6- Promotor enthält, wurde in den mit EcoRI und HindIII geschnittenen Vektor M13mp19amIV einkloniert. Daraus resultierte der Klon M13-Ha88(+), der die PSTV-DNA in (+) Orientierung enthält. Dieser M13-Vektor wurde auf dem Suppressorstamm JM103 vermehrt.

Die zirkuläre einzelsträngige DNA des Klones M13-Ha88(+) wurde in den Mutagenese-Experimenten als eine Komponente für die Bildung von "gapped duplex" DNA eingesetzt. Dazu wurde sie mit dem linearen doppelsträngigen EcoRI-HindIII-Fragment des Nicht-Amber-Phagen M13mp19, sowie dem entsprechenden mutagenen DNA-Oligonukleotid gemischt. Nach Durchführung der Mutagenesereaktionen erfolgte die Transfektion in den E.coli-Mutator-Stamm WK6-MutL und die Vermehrung und Selektion der Mutanten auf dem Non-Suppressor-Stamm BMH71/18.

5.5.3 Die Mutagenese der PSTV-DNA und die Infektiosität der mutierten PSTV-RNAs

Im Kapitel Materialien wurden die mutagenen DNA-Oligonukleotide aufgeführt, die für die verschiedenen Mutageneseexperimente verwendet wurden.

Mutagenese in den duplizierten Regionen des Klones pHa88 :

Das SP6-RNA-Transkript des Klones pHa88 besitzt trotz des kurzen duplizierten Bereiches von nur sechs Nukleotiden UCAGGG zwischen den Positionen 83-88 eine ungewöhnlich hohe spezifische Infektiosität. Es wurde daher angenommen, daß die inokulierte SP6-RNA in der Pflanze in genau diesem Bereich der sechs Nukleotide spezifisch zu einem linearen PSTV-Molekül zurechtgeschnitten und anschließend zu einem Ringmolekül ligiert wird. Nach dieser "Prozessierungsreaktion" würde ein monomeres, zirkuläres PSTV-RNA-Molekül entstehen, das identisch zu dem natürlicherweise vorkommenden Viroid wäre. Durch die in vitro Mutagenese sollte die Rolle der individuellen Nukleotide innerhalb dieser duplizierten Region untersucht werden. In der sog. SS-Serie wurde der "linke" (sinister) 5'-Bereich der RNA mutagenisiert und in einer zweiten DD-Serie das "rechte" (dexter) 3'-Ende der PSTV-RNA.

Die Ergebnisse der Infektiositäts-Teste der mutierten PSTV-RNAs beider Serien sind in den Tabellen 9a und 9b aufgelistet und in Abb. 16 zusammengefaßt :

Tabelle 9a : Infektiositätstest mit mutierten PSTV (+) SP6-RNAs des Klones M13-Ha88

Test Nummer	DNA Matrize	Enzym für die Linearisierung	µg RNA pro Pflanze	Infektionsindex von 10 Pflanzen Tage nach der Inokulation :										
				18	19	20	21	24	25	27	31	33	40	60
1.	pHa88	EcoRI	1.0	0	2	5	5	8	9	10	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
2.	M13-SS1	EcoRI	1.0	1	4	4	5	10	/	/	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3
3.	M13-SS2	EcoRI	1.0	1	5	5	6	9	9	10	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
4.	M13-SS3	EcoRI	1.0	0	3	4	5	10	/	/	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	2	3	3	3	4
5.	M13-SS4	EcoRI	1.0	1	2	3	3	7	9	10	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3
6.	M13-SS5	EcoRI	1.0	0	0	0	0	4	5	8	9	9	10	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9b : Infektiositätstest mit mutierten PSTV (+) SP6-RNAs des Klones M13-Ha88

Test Nummer	DNA Matrize	Enzym für die Linearisierung	µg RNA pro Pflanze	Infektionsindex von 10 Pflanzen Tage nach der Inokulation :									
				18	19	20	21	23	26	28	30	33	40
1.	pHa88	EcoRI	1.0	6	6	7	9	10	/	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	2	3	3	4	6	7
2.	M13-SS1	EcoRI	1.0	5	5	6	7	9	10	/	/	/	/
3.	M13-SS6	EcoRI	1.0	0	2	3	7	7	7	7	10	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4.	M13-SS7	EcoRI	1.0	0	0	0	1	3	3	3	4	5	9
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	M13-DD1	EcoRI	1.0	2	2	9	10	/	/	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	1	1	2	2	2	4
6.	M13-DD2	EcoRI	1.0	4	5	10	/	/	/	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	1	1	2	2	5	5	7	7
7.	M13-DD3	EcoRI	1.0	0	0	4	7	9	10	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	2	2	2	2	3	3
8.	M13-DD4	EcoRI	1.0	0	1	6	7	10	/	/	/	/	/
	"	"	0.01	0	0	1	2	2	4	7	7	7	7
9.	M13-DD5	EcoRI	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	M13-VM2	EcoRI	1.0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	7
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	M13-OF1	EcoRI	1.0	0	0	0	3	3	4	6	8	10	/
	"	"	0.01	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

Einfluß von Mutationen innerhalb der duplizierten Region des Plasmides pHa88

auf die spezifische Infektiosität der resultierenden SP6 RNA Transkripte

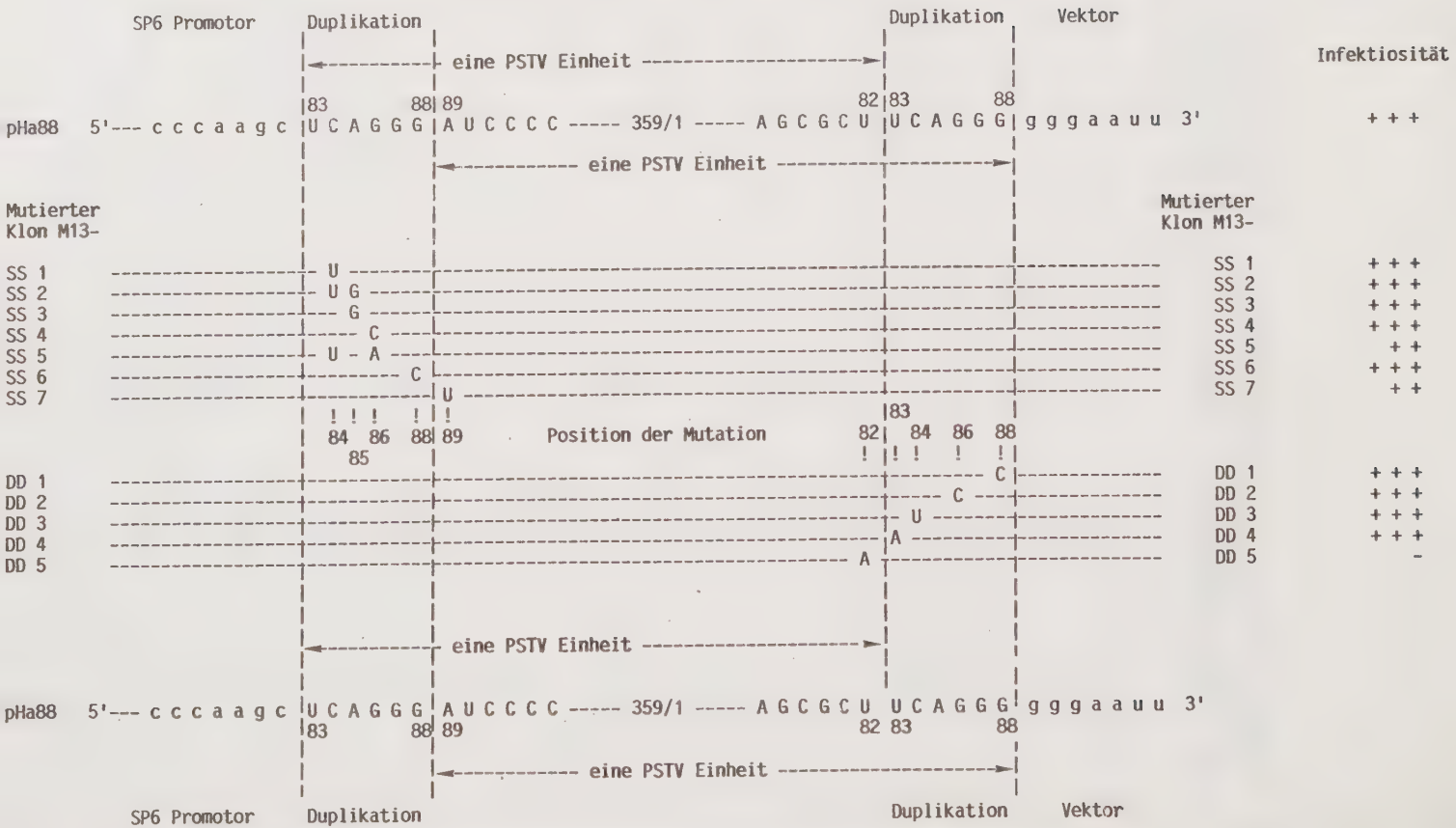


Abbildung 16: Zusammenfassende Darstellung über die spezifischen Infektiositäten von PSTV-RNA-Transkripten, die innerhalb der duplizierten Region der DNA von Plasmid pHa88 mutiert wurden.

Im oberen wie im unteren Teil der Abbildung ist das SP6-RNA-Transkript des Klones pHa88 angegeben. Die flankierenden Vektorsequenzen sind in Klein-, die PSTV-Sequenzen in Großbuchstaben angegeben. Von den 46 Fremdnukleotiden am 5'-Ende sind lediglich die randständigen 7 Nukleotide CCCAAGC wiedergegeben, während auf der 3'-Seite die sieben Nukleotide GGGAAUU den gesamten Fremdsequenzen entsprechen. Der duplizierte PSTV-Bereich UCAGGG der Nukleotide 83-88 ist durch vertikale Linien gekennzeichnet. Es ist angezeigt, daß aus dem RNA-Transkript von Klon pHa88 jeweils eine vollständige PSTV-RNA-Einheit durch einen Schnitt auf der 5'-Seite des duplizierten Nukleotides U_{83}, sowie durch einen Schnitt auf der 3'-Seite von Nukleotid G_{88} theoretisch freigesetzt werden könnte. Die Freisetzung einer PSTV-RNA-Einheit ist selbstverständlich auch bei einer beiderseitigen Spaltung einer beliebigen Bindung innerhalb der duplizierten Hexamer-Sequenz möglich. Der Infektiositätstest mit den gezeigten Mutanten hatte das Ziel, die in vivo benutzte Spaltungsstelle zu lokalisieren.

Im mittleren Teil der Abbildung sind die gegenüber dem Transkript von Plasmid pHa88 mutierten Nukleotide der Klone M13-SS1 bis M13-SS7 bzw M13-DD1 bis M13-DD5 aufgeführt. Der Effekt der Mutationen auf die spezifische Infektiosität der resultierenden RNA-Transkripte ist in der rechten Spalte wiedergegeben. Die verwendeten Symbole haben folgende Bedeutung :

+++ : alle Testpflanzen entwickeln die PSTV-Krankheitssymptome in etwa der gleichen Zeit wie nach der Inokulation mit einer oligomeren RNA;

++ : alle oder nahezu alle Testpflanzen entwickeln PSTV-Symptome, jedoch erst nach einer längeren Latenzzeit;

\+ : nur einige Testpflanzen entwickeln PSTV-Symptome;

\- : Keine der Testpflanzen entwickelt PSTV-Symptome.

Die Mutanten-RNAs, die innerhalb der duplizierten Region mutiert worden waren, also SS1 - SS6 (Tabellen 9a, Nr. 2-6; 9b, Nr.2,3) ebenso DD1 - DD4 (Tabelle 9b, Nr.5-8), waren ausnahmslos infektiös. Dagegen war bei den Mutanten, bei denen das jeweilige, der Duplikation benachbarte Nukleotid mutiert worden war, lediglich die Mutante SS7 infektiös, nicht aber die RNA von Klon DD5 (Tabelle 9b, Nr. 4,9). Die Viroid-Nachkommenschaft folgender infektiöser SP6-RNAs wurde sequenziert : SS1, SS4, SS6, SS7, DD1, DD4. Überraschenderweise stellte sich heraus, daß alle diese PSTV-RNAs im fraglichen Bereich nicht mutiert waren. Anhand dieses Ergebnisses kann daher nicht entschieden werden, ob in den infektiösen RNAs jeweils die unmutierte duplizierte Region zur Infektionsauslösung beigetragen hat, oder ob die ursprüngliche Mutation wieder revertierte. Daß eine solche Reversion möglich ist, zeigt das Beispiel der RNA von Klon M13-SS7, denn hier liegt die Mutation außerhalb des duplizierten Bereiches und kann daher nicht durch eine Wildtyp-Sequenz am anderen Ende des Transkriptes ausgeglichen werden. Allerdings zeigt die Mutante DD5, daß andererseits nicht jede Mutation revertieren kann.

Mutagenese "ohne Funktion":

Es sollte eine Mutation durchgeführt werden, die zwar zu einer Änderung der Sequenz führt, die aber ohne wesentlichen Einfluß auf die Sekundärstruktur der PSTV-RNA ist. Man sollte daher erwarten, daß eine solche Mutation toleriert wird. Aus diesem Grunde wurde das C_{208} in das Nukleotid U mutiert. Betrachtet man das Sekundärstrukturmodell der PSTV-RNA (siehe auch Abb. 1) in dem C_{208} mit G_{153} inmitten von fünf basengepaarten Nukleotiden wechselwirkt, so ist zu erwarten, daß die Mutation von C nach U zu keiner nachhaltigen Änderung der Stabilität in dieser Region führt.

Sekundärstruktur der PSTV-Wildtyp-Sequenz :

```
      150                 160
       !    153            !
       A C   !       U A A U U
--- C G     A G G A G           C C C G ---
--- G C     U C C U U           G G G C ---
       G C   !       C C U G U
       !     208             !
      211                   200
```

Die Sekundärstruktur der so erzeugten PSTV-Mutante OF zeigt den C-U Austausch bei Nukleotid 208 :

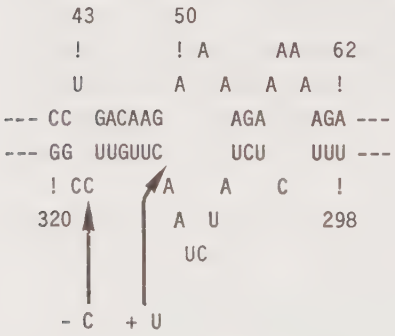
```
      150                 160
       !    153            !
       A C   !       U A A U U
--- C G     A G G A G           C C C G ---
--- G C     U U C U U           G G G C ---
       G C   !       C C U G U
       !     208             !
      211                   200
```

Im Infektiositätstest erwies sich die Mutante OF als infektiös (Tabelle 9b, Nr.11). Die Sequenzanalyse zeigte jedoch, daß die künstlich erzeugte Mutante OF zum Wildtyp-PSTV-Isolat PSTV-KF440-2 revertiert war und somit wieder in Position 208 das Nukleotid C besaß .

Mutagenese in der VM-Region :

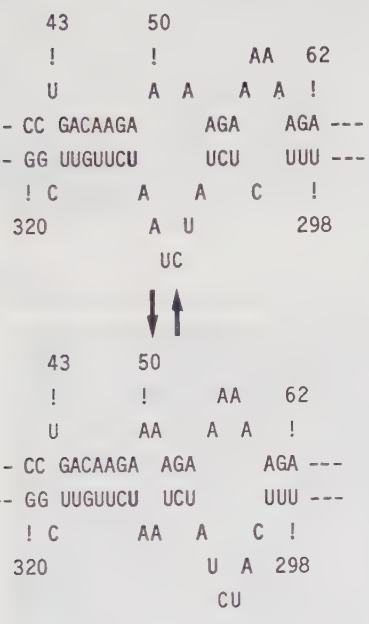
Eine der entscheidenden Aussagen, die sich aus dem Sequenzvergleich verschieden virulenter PSTV-Isolate ergaben (Schnölzer et al. 1985), war der Befund, daß die thermodynamische Stabilität der sog. "Virulenz-modulierenden" (VM) Region der RNA eines gegebenen Isolates und das Ausmaß seiner Virulenz miteinander korreliert werden können. Dieser Sachverhalt sollte anhand einer gezielten Mutagenese in der VM-Region des PSTV-Moleküles überprüft werden.

Nachstehend wird im einzelnen dargestellt, in welcher Konformation die VM-Region des PSTV-Isolates KF440-2 gemäß Schnölzer et al. (1985) vorliegt und welche Mutationen in VM2 eingeführt wurden :



Es sollte das C_{317} deletiert werden und zusätzlich ein U-Nukleotid zwischen A_{310} und C_{311} insertiert werden.

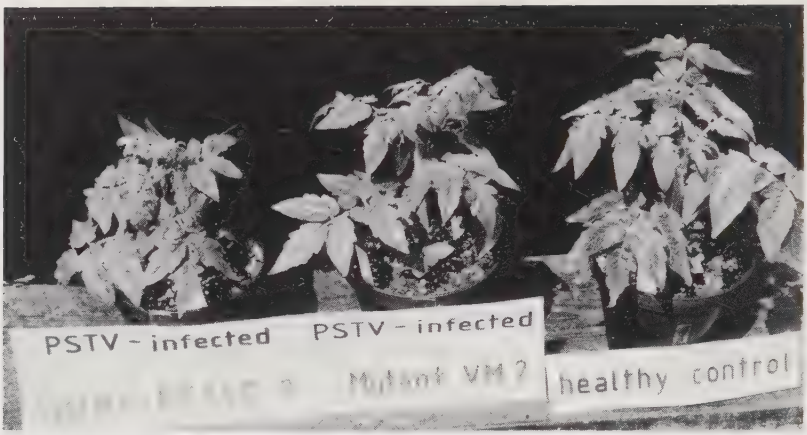
Daraus sollte sich folgende Sekundärstruktur ergeben :



Beide möglichen Sekundärstrukturen der VM-Region der Mutante VM2 sollten daher stabiler sein, als die des Ausgangsisolates KF440-2.

Der Biotest zeigte, die SP6-RNA des Klones M13-VM2 infektiös war (siehe Tabelle 9b, Nr. 10). Übereinstimmend mit dem Befund von Schnölzer et al. (1985) zeigten die mit VM2 infizierten Tomatenpflanzen tatsächlich mildere Krankheitssymptome als die Kontrollpflanzen, die mit der RNA des Klones OF oder pHa88 infiziert worden waren.

A



B

Abbildung 17: Symptomausprägung bei zwei repräsentativen Tomatenpflanzen (Buschtomate "Rentita"), die mit verschiedenen PSTV-RNAs inokuliert wurden.

Die gezeigten Pflanzen wurden mit der PSTV-Nachkommenschaft inokuliert, die auf Pflanzen erhalten wurde, welche ihrerseits mit der Nachkommenschaft von Tomatenpflanzen infiziert worden waren, die ursprünglich mit den SP6-RNA-Transkripten der Plasmide pHa88 bzw M13-VM2 inokuliert worden waren. Es handelt sich also hierbei um Tomatenpflanzen der "3. Generation".

C

Bild **A** zeigt die Symptomausprägung der PSTV-Infektion 20 Tage nach der Inokulation, was einem relativ frühen Stadium der Symptombildung entspricht. Bereits hier wird deutlich, daß der Krankheitsverlauf bei der Pflanze, die mit der künstlich hergestellten PSTV-Mutante VM-2 inokuliert wurde, milder verläuft als bei der Pflanze, die mit der Nachkommenschaft des RNA-Transkriptes von Klon pHa88 infiziert wurde, also mit PSTV-RNA, die dem Isolat KF440-2 entspricht. Während die letztgenannte Tomatenpflanze schon deutlich im Wuchs zurückgeblieben ist und die Spitzenblätter bereits Epinastie zeigen, sind bei der mit der PSTV-Mutante VM-2 infizierten Pflanze - verglichen zur gesunden Kontrolle - erst schwach entwickelte Krankheitssymptome festzustellen.

Bild **B** zeigt den Zustand der Pflanzen 40 Tage nach der Inokulation. Beide PSTV-Isolate haben nun, verglichen mit der gesunden Kontrolle, kräftige Symptome entwickelt. Der Krankheitsverlauf ist allerdings bei der mit Mutante VM-2 inokulierten Pflanze noch immer schwächer als bei der nicht mutierten Kontrolle.

Bild **C** wurde zum gleichen Zeitpunkt aufgenommen wie Bild B. Es zeigt noch deutlicher, daß die Inokulation mit dem RNA-Transkript von Plasmid pHa88 und der sich daran anschließenden Infektion mit dem PSTV-Isolat KF440-2 zu einer stärkeren Wuchshemmung führt als die Infektion mit der PSTV-Mutante VM-2.

Die Viroid-Nachkommenschaft einer mit dem SP6-Transkript von Klon M13-VM2 infizierten Pflanze wurde erneut auf eine gesunde Tomate übertragen, und diese Re-Infektion ein weiteres Mal wiederholt. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem weniger stark ausgeprägten Krankheitsbild, das durch die künstlich erzeugte PSTV-Mutante VM2 erzeugt wird, um einen Konzentrationseffekt handelt, da für die Ausprägung von Viroid-Symptomen eine bestimmte Schwell-Konzentration an Viroid-RNA in der Pflanze vorhanden sein muß. Abb. 17 zeigt eine typische Pflanze, die in der "dritten Generation" mit VM2 infiziert ist und zwar 15 bzw 40 Tage nach der Inokulation. Im Vergleich dazu sind Pflanzen abgebildet, die zur gleichen Zeit mit SP6-RNAs der Klone OF und pHa88 inokuliert wurden. Bei ihnen erkennt man erkennt deutlich die stärker ausgeprägten Krankheitssymptome der Viroidinfektion. Die Sequenzierung der Viroid-RNA, die aus der gezeigten Pflanze isoliert wurde, ergab, daß die eingeführten Mutationen auch in der 3. Generation erhalten geblieben und somit tatsächlich für den Unterschied in der Virulenz der RNA verantwortlich waren.

5.6 Sequenzierung von PSTV-RNA aus Einzelpflanzen

Nachdem in bestimmter Weise mutierte PSTV-RNA sich als infektiös erwiesen hatte, mußte die entsprechende PSTV-RNA-Nachkommenschaft daraufhin überprüft werden, ob die entsprechenden Mutationen auch erhalten geblieben waren.

Da der Gehalt an Viroid-RNA in infiziertem Blattgewebe sehr gering ist, mußten in der Vergangenheit stets sehr große Mengen an Pflanzen-Material aufgearbeitet werden, um die daraus gewonnene Viroid-RNA entweder direkt (Gross et al., 1978; Gross et al., 1981; Gross et al., 1982) oder über ihre daraus durch reverse-Transkription gewonnene cDNA sequenzieren zu können (Schnölzer et al. 1985). Eine Klonierung der cDNA ist für die Sequenzierung nicht erforderlich.

Da die Möglichkeit bestand, daß sich die in gleicher Weise mutierte PSTV-RNA in verschiedenen Tomatenpflanzen unterschiedlich verhält, war es angebracht, möglichst die PSTV-Nachkommenschaft aus einer einzelnen Pflanze zu untersuchen. Dafür mußte die geringe Menge an Viroid-RNA aus einer einzigen Pflanze stark angereichert und die Methode der Sequenzierung von Viroiden wesentlich verfeinert werden. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte dann auf der Ebene der cDNA. Diese wurde mit Hilfe von geeigneten endmarkierten DNA-Oligonukleotiden bzw Restriktionsfragmenten aus klonierter PSTV-DNA mittels reverser-Transkription aus der PSTV-RNA synthetisiert. Die so erhaltene endmarkierte cDNA wurde dann nach der Methode von Maxam und Gilbert (1980) sequenziert.

Methodik:

Aus ca 1-2 g jungem PSTV-infizierten Blattgewebe wurden zunächst die Gesamt-Nukleinsäuren mit Hilfe von Phenol extrahiert. Es gelang aus diesem rohen Extrakt durch wiederholte LiCl-Fraktionierung den größten Anteil an hochmolekularen RNAs und DNAs abzutrennen. Für eine spezifische reverse-Transkription durch Primer-Verlängerung reichte jedoch der Reinheitsgrad bei weitem nicht aus. Deshalb wurde die angereicherte PSTV-Fraktion nunmehr auf einem 5% igen Polyacrylamidgel in Anwesenheit von 8 M Harnstoff bei 45°C aufgetrennt. Unter diesen

denaturierenden Bedingungen wandert die zirkuläre PSTV-RNA, im Gegensatz zu ihrem linearen Anteil, weitaus langsamer als es ihrem Molekulargewicht entspricht (Sänger et al., 1979). Da andere zelluläre RNAs oder DNAs, die ähnliche Wanderungsgeschwindigkeiten haben könnten, bereits durch die LiCl-Fraktionierung entfernt wurden, können sie die elektrophoretische Trennung nicht stören. Aus diesem Grunde konnte die zirkuläre PSTV-RNA auf einem solchen Gelsystem leicht mit Hilfe eines PSTV-RNA-Markers identifiziert werden und somit zuverlässig von anderen RNAs abgetrennt werden. Nach Färbung mit Ethidiumbromid konnte der Gelstreifen mit der zirkulären PSTV-RNA ausgeschnitten und die RNA mittels Isotachophorese aus dem Gel eluiert werden.

Die so eluierte zirkuläre PSTV-RNA erwies sich als zu mindestens 95 % rein, wobei die restlichen Verunreinigungen die reverse-Transkription nicht störten, die ohnehin aufgrund des verwendeten PSTV-spezifischen DNA-Primers ausschließlich an der PSTV-RNA initiiert wird.

Auf diese Art und Weise war es möglich, genügende Mengen an endmarkierter PSTV-cDNA für analytische Zwecke herzustellen. Da wegen der ausgeprägten Sekundärstruktur der Viroid-RNA bei der reversen Transkription stets auch vorzeitige Kettenabbrüche entstehen, die naturgemäß bei der anschließenden Sequenzierung der cDNA stören, war eine weitere Aufreinigung der cDNA über ein denaturierendes Polyacrylamidgel nötig. Die so gewonnene PSTV-cDNA, die mindestens 300 Nukleotide lang war, wurde dann nach Maxam und Gilbert sequenziert.

Durch Verwendung von zwei bzw drei verschiedenen DNA-Primern konnten sich überlappende PSTV-cDNAs mit unterschiedlichem 5'-Ende hergestellt werden, die es schließlich erlaubten, die Sequenz der gesamten zirkulären PSTV-RNA zu bestimmen.

6. DISKUSSION

6.1 Infektionsstudien mit genomischen und subgenomischen Einheiten von PSTV-DNA und PSTV-RNA

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Biotests haben gezeigt, daß die Mehrzahl der getesteten rekombinanten PSTV-DNAs und die mit ihrer Hilfe daraus synthetisierten PSTV-RNAs in der Lage sind, nach mechanischer Inokulation von Blättern junger Tomatenpflanzen eine normale PSTV-RNA-Replikation in Gang zu setzen und das für eine PSTV-Infektion typische Krankheitsbild hervorzurufen.

Im engeren Sinne der Definition allerdings sind diese Nukleinsäuren eigentlich nicht "infektiös", weil sie nicht in der Lage sind, ihre eigene Replikation zu induzieren. Sie initiieren vielmehr die Replikation einer in der Primärstruktur identischen Nukleinsäure, nämlich die der zirkulären und linearen PSTV-RNA mit ihren 359 Nukleotiden. Wenn man allerdings den Begriff "Infektiosität" weiter faßt und auch ganz allgemein auf die Fähigkeit anwendet, eine Infektion auszulösen, dann hat er durchaus seine Berechtigung. Der Begriff "Infektiosität" wird im folgenden daher stets in diesem Sinne verwendet.

6.1.1 Infektiosität von oligomeren doppel- und einzelsträngigen PSTV-DNAs

Alle Formen der doppelsträngigen PSTV-DNAs, die aus mindestens zwei Kopf-Schwanz-verknüpften Genom-Einheiten bestanden und im Infektionstest auf ihre biologische Aktivität hin überprüft wurden, erwiesen sich als infektiös. Dies war insofern nicht ohne weiteres zu erwarten, da eine PSTV-spezifische DNA während der normalen, auf dem RNA-RNA Wege ablaufenden Viroid-Replikation nicht auftritt (Branch und Dickson, 1980; Zaitlin et al., 1980; Rohde und Sänger, 1981; Hadidi et al., 1981). Der Befund, daß klonierte doppelsträngige dimere DNA-

Formen von Viroiden eine Infektion auslösen können, wurde zuerst von Cress et al., (1983) bei klonierter PSTV-DNA beobachtet. Inzwischen wurde festgestellt, daß auch die doppelsträngigen DNAs des Hop Stunt Viroids (HSV) (Ohno et al., 1983; Meshi et al., 1984), sowie des Citrus Exocortis Viroids (CEV) hoch infektiös sind (Visvader et al., 1985).

Die mechanische Inokulation mit PSTV-DNA führt reproduzierbar und mit relativ hoher Effektivität zu PSTV-Infektionen und zur Ausprägung normaler PSTV-Symptome. Daher muß man annehmen, daß die biologische Aktivität der PSTV-DNA nicht darauf beruht, daß eines der DNA-Moleküle zufällig in den Zellkern gelangt, wo die PSTV-Replikation normalerweise stattfindet (Spiesmacher et al., 1985). Außerdem dürfte die PSTV-DNA auch nicht einfach mehr oder weniger zufällig transkribiert werden, sondern es ist vielmehr wahrscheinlich, daß Wirtskomponenten, die normalerweise mit der Viroid-RNA wechselwirken, auch eine Affinität zur Viroid-DNA besitzen und auf diesem Weg beitragen, die Infektion in Gang zu bringen.

Alle PSTV-Infektionen, die durch mechanische Inokulation mit klonierter doppelsträngiger PSTV-DNA verursacht werden, sind zweifelsohne das Resultat einer ganzen Reihe von mehr oder weniger komplexen biolgischen Reaktionen in der Wirtszelle. Allerdings lassen sich über die Art und Weise wie dies geschieht nur indirekte Angaben machen. Es ist offensichtlich so, daß die doppelsträngige Viroid-DNA zunächst durch die mechanische Inokulation in die Wirtszelle eingebracht wird, wo sie sehr wahrscheinlich in den Nukleus gelangt. Da sich später dort Viroid-RNA anhäuft, muß die eingeschleuste DNA zwangsläufig in RNA transkribiert worden sein. Es ist anzunehmen, daß die ersten auf diesem Wege in vivo erzeugten RNA-Transkripte dann die eigentliche Viroid-Replikation in Gang setzen.

Die Infektionsexperimente haben gezeigt, daß die klonierte PSTV-DNA alleine und ohne flankierende Fremdsequenzen in der Lage ist, eine PSTV-Infektion auszulösen. Diese DNA benötigt daher zu ihrer in vivo Transkription offenbar keinen externen Promotor. Sie muß daher selbst eine gewisse Affinität zu einer der drei nukleären DNA-abhängigen RNA-Polymerasen besitzen, obwohl eine PSTV-DNA in der Wirtszelle natürlicherweise gar nicht vorkommt. Man kann also annehmen, daß die

PSTV-DNA selbst über eine Promotoreigenschaft verfügt, die ihr folglich eine spezifische Transkription erlaubt. Aufgrund der Infektiositätsdaten läßt sich leider nicht entscheiden, welche der drei RNA-Polymerasen für die Transkription der klonierten DNA in RNA verantwortlich ist. Theoretisch wäre es möglich, daß außer den nukleären RNA-Polymerasen sogar die mitochondriale und die plastidäre RNA-Polymerase dafür in Frage kämen. Dagegen spricht allerdings, daß, zumindest bei PSTV der Zellkern der Ort der Viroidreplikation ist (Spiesmacher et al., 1985).

Weiterhin ist noch ungeklärt, ob PSTV-RNAs beider Polaritäten synthetisiert werden. Die Beobachtung, daß die (+) RNA das eigentliche infektiöse Agens ist, legt allerdings den Schluß nahe, daß diese PSTV (+) RNA auch in vivo synthetisiert wird.

Da sich bei Viroiden die mechanisch inokulierte doppelsträngige DNA als infektiös erwiesen hat, ähnelt sie in dieser Hinsicht einigen RNA-Viren, denn auch klonierte doppelsträngige DNA der einzelsträngigen linearen RNA des Bakteriophagen Qß (Taniguchi et al., 1978), sowie des Poliovirus (Racaniello und Baltimore, 1981) sind infektiös. Eine etwas andere Situation existiert bei den Retroviren, bei denen es zahlreiche Beispiele dafür gibt, daß klonierte DNA eine Retrovirus-Infektion in Gang setzen kann (zB O'Rear et al., 1980; Scott et al., 1981; Kim et al., 1982). Allerdings tritt im Falle der Retroviren jedoch auch während des normalen Replikationszyklus eine intermediäre Virus-spezifische DNA-Form auf. Die klonierte infektiöse DNA der Retroviren ähnelt somit ihrer proviralen DNA. Aus diesem Grunde sind Retroviren in dieser Hinsicht nicht mit RNA-Viren oder Viroiden vergleichbar.

Nicht nur die oligomere doppelsträngige DNA von Viroiden, sondern auch ihre klonierte einzelsträngige DNA erwies sich als infektiös, was auch von Hashimoto und Machida für das PSTV bestätigt wurde (1985). Dabei spielt es keine Rolle, ob die DNA von (+) oder (-) Polarität ist. Dieser Befund ist insofern überraschend als in einer eukaryontischen Zelle einzelsträngige DNA normalerweise gar nicht vorkommt. Daher erhebt sich die Frage, über welchen Weg solche infektiösen einzelsträngigen DNAs die Viroid-Replikation initiieren.

Die einzige Ausnahme von der Regel, daß natürliche DNA in Doppelstrangform vorliegt, findet man bei bestimmten Viren mit zirkulärem einzelsträngigem DNA-Genom. Diese Einzelstrang-DNA-Viren, zu denen zB der Bakteriophage M13 sowie die pflanzlichen Geminiviren gehören, werden nach ihrem Eindringen in die Wirtszelle von den zellulären Enzymen zu einer Duplex-DNA ergänzt, die ihrerseits als Matrize für die Synthese von Virus-spezifischer mRNA dient. Daher ist es naheliegend, daß auch die inokulierte einzelsträngige PSTV-DNA zunächst in vivo zum Doppelstrang ergänzt wird. Damit wird der gleiche Zustand erzeugt, wie bei der direkten Inokulation von oligomerer doppelsträngiger PSTV-DNA. Solange die inokulierte Einzelstrang-DNA zur Doppelstrang-DNA ergänzt wird, spielt ihre Polarität nur eine untergeordnete Rolle, da sie in beiden Fällen zu dem gleichen Doppelstrang führt. Sofern die Doppelstrang-DNA an sich schon infektiös ist, kann man annehmen, daß der Vorgang der Infektionsauslösung durch Einzelstrang-DNA lediglich etwas komplexer wird, ohne daß er allerdings prinzipiell nach einem anderen Mechanismus abzulaufen braucht. Dieser Sachverhalt ist im Einklang mit der etwas geringeren spezifischen Infektiosität von einzelsträngiger PSTV-DNA, wenn man sie mit der entsprechenden Doppelstrang-DNA vergleicht.

Es ist allerdings theoretisch denkbar, daß die einzelsträngige DNA auch auf direktem Wege in RNA transkribiert wird, da eine solche Reaktion mit isolierten RNA-Polymerasen I,II und III zumindest in vitro möglich ist (M. Tsagris, unpubliziertes Ergebnis).

6.1.2 Infektiosität von einzel- und doppelsträngigen, Vektor-insertierten, monomeren PSTV-DNAs

Rekombinante DNA-Vektoren, die eine monomere PSTV-DNA-Einheit enthalten, besitzen im Gegensatz zu denjenigen mit dimeren und höher oligomeren PSTV-DNAs eine erheblich geringere spezifische Infektiosität. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich um doppelsträngige oder einzelsträngige monomere PSTV-DNA handelt. Mit Ausnahme der einzel- oder doppelsträngigen DNA des Klones M13-40(+) zeigten bei der Inokulation von erheblichen Mengen an monomerer Vektor-insertierter PSTV-DNA in sieben anderen Fällen höchstens jeweils eine von 10 Testpflanzen nach einer relativ langen Inkubationszeit PSTV-Symptome.

Bei drei der sieben monomeren PSTV-DNAs, nämlich bei der einzelsträngigen DNA des Klones M13-40(-) und bei den doppelsträngigen DNAs der Klone pSP-A1(+) und (-) mit ihren AluI-Einheiten der PSTV-DNA, wurden sogar überhaupt keine Infektionen festgestellt.

Angesichts der großen Menge der zur Inokulation benutzten DNA muß man annehmen, daß die jeweils resultierenden Infektionen mehr das Resultat eines "ungewöhnlichen" Vorgangs in der Pflanze sind und somit mehr oder weniger zufällig auftreten. Es könnte sich dabei zB um Rekombinationsprozesse innerhalb der inokulierten monomeren DNA handeln, die im Bereich der kurzen Sequenzwiederholung innerhalb der BamHI- bzw AvaII-Erkennungssequenz auftreten. Es ist zumindest theoretisch denkbar, daß mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit zwei DNA-Moleküle in dem genannten Bereich rekombinieren und eine dimere DNA bilden können. Möglicherweise würde eine solche Rekombination durch die besondere Sekundärstruktur der Viroid-DNA begünstigt. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß die DNA der beiden Klone pSP-A1(+) und (-), die jeweils die monomere AluI-Einheit von PSTV-DNA tragen, überhaupt keine Infektionen auslösten. Dadurch, daß AluI nur gerade Enden erzeugt, entstanden in diesem Falle eben keine solchen kurzen Sequenzwiederholungen, die eine Rekombination ermöglichen könnten.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß Vektor-insertierte monomere PSTV-DNAs gelegentlich PSTV-Infektionen auslösen können, wenngleich dies auch mit einem weitaus unspezifischeren Mechanismus zu geschehen scheint als mit den entsprechenden dimeren Konstrukten. Dieser Befund stand zunächst im Gegensatz zu dem Bericht von Cress et al. (1983), die berichtet hatten, daß Vektor-insertierte monomere PSTV-DNA nicht infektiös sei. Inzwischen wird unser Befund allgemein jedoch anerkannt, daß die monomeren Vektor-insertierten Viroid-DNAs gelegentlich Infektionen auslösen können (siehe Diener, 1986).

6.1.3 Infektionsverhalten des (+) orientierten monomeren BamHI-Klones M13-40(+)

Völlig abweichend von den beschriebenen Infektionseigenschaften der monomeren Vektor-insertierten PSTV-DNA verhielt sich die DNA des Klones M13-40(+). Nach der Inokulation mit seiner Doppelstrang-Form wurden immerhin 4 von 10 Testpflanzen krank, während nach der Inokulation mit seiner Einzelstrang-Form sogar 8 von 10 Tomatenpflanzen Symptome zeigten. Die spezifische Infektiosität war damit zwar geringer als bei den vergleichbaren dimeren Formen, jedoch war sie gleichzeitig erheblich höher als bei allen anderen vergleichbaren monomeren Formen. Wie bereits im Ergebnisteil ausgeführt wurde, entsteht bei der Verknüpfung einer BamHI-PSTV-DNA-Einheit mit der BamHI-Schnittstelle des Polylinkers des Bakteriophagen M13mp11 im Falle der (+) Orientierung der Insertion eine Duplikation der 11 PSTV-Nukleotide 87-97 : GGATCCCCGGG. Verglichen mit der in (-) Orientierung insertierten BamHI-PSTV-DNA von Klon M13-40(-) oder der von Plasmid pMT40 besitzt der Klon M13-40(+) damit eine um die fünf Nukleotide 93-97 (CCGGG) längere Duplikation. Diese Differenz scheint für die unterschiedliche Infektiositätsrate der verschiedenen Vektoren mit monomeren BamHI-PSTV-DNA-Einheiten verantwortlich zu sein.

Es fiel bereits frühzeitig auf, daß die duplizierte Region, welche der an sich monomeren DNA von Klon M13-40(+) eine relativ hohe spezifische Infektiosität verleiht, im Bereich des PSTV-Moleküles liegt, der bei allen Viroiden, mit Ausnahme des Avocado Sunblotch Viroides (ASBV) hoch konserviert ist. Da die sogenannte "zentrale konservierte Region" bei verschiedenen Viroid-Spezies vorkommt, wurde ihr eine entscheidende Bedeutung für die Replikation beigemessen (siehe Sänger, 1982). Infektionsversuche mit den klonierten DNAs von anderen Viroiden bestätigten diesen Sachverhalt. So erhielten Visvader et al. (1985) nach Inokulation mit klonierter DNA des Citrus Exocortis Viroides (CEV) ebenfalls Infektionen, sofern exakt der gleiche Bereich wie bei PSTV dupliziert vorlag. Auch die klonierte DNA des Tomato Apical Stunt Viroides (TASV) und des Tomato Planta Macho Viroides (TPMV) verhielten sich in gleicher Weise (Owens et al., 1986). Auch systematische Infektionsstudien mit klonierter DNA des HSV zeigten schließlich, daß nach

mechanischer Inokulation immer nur dann Infektionen auftraten, wenn die zentrale konservierte Region in duplizierter Form vorlag (Meshi et al., 1985).

Angesichts dieser Infektiositätsdaten der Vektor-insertierten monomeren Viroid-DNAs wurde vermutet, daß die Sequenz der zentralen konservierten Region der Viroid-RNAs eine Erkennungsregion für eine spezifische Endonuklease enthält. Das in vivo erzeugte RNA-Transkript von einer DNA mit einer kurzen Duplikation im Bereich dieser Erkennungssequenz würde dann möglicherweise das korrekte Herausschneiden einer linearen, exakt monomeren Viroid-RNA ermöglichen. Auf diese Weise würde die Viroid-RNA von den sie umgebenden Vektorsequenzen befreit. Anschließend könnte die lineare Viroid-RNA zu dem monomeren Zirkel ligiert werden. Das somit aus der inokulierten Vektor-insertierten Viroid-DNA entstandene Viroid-RNA-Molekül würde dann die eigentliche Viroid-RNA-Replikation und somit die Infektion der Pflanze in Gang setzen. Die geschilderte Hypothese wurde mit Hilfe weiterer Infektiositätsexperimente insbesondere mit den partiell duplizierten SP6-RNA-Transkripten überprüft.

6.1.4 Infektiosität von monomeren oder subgenomischen PSTV-Doppelstrang-DNAs ohne Fremdsequenzen

Die im allgemeinen geringe spezifische Infektiosität von monomeren PSTV-DNAs wurde erheblich gesteigert, sobald die monomere PSTV-Doppelstrang-DNA durch Restriktionsenzyme aus der sie umgebenden Vektor-DNA herausgeschnitten wurde. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Vektor-DNA, aus der das monomere PSTV-DNA-Fragment freigesetzt wurde, abgetrennt wurde oder nicht. Die spezifische Infektiosität der freien monomeren PSTV-DNA-Einheit war allerdings etwas geringer als bei den entsprechenden oligomeren PSTV-DNA-Formen.

Es erhebt sich also die Frage, weshalb die Freisetzung der monomeren PSTV-DNA mit Restriktionsenzymen eine erhöhte spezifische Infektiosität hervorruft. Es wurde angenommen, daß dafür nicht in erster Linie das Herausspalten aus der Vektor-DNA an sich verantwortlich ist, sondern daß dies letztlich auf der wiederhergestellten Ligationsfähigkeit der freigesetzten monomeren PSTV-DNA beruht. Die inokulierte PSTV-DNA besitzt aufgrund der entsprechenden Restriktionsverdaus die

geeigneten kohäsiven Enden, die eine Ligation in vivo erleichtern sollten. Somit können die monomeren PSTV-DNA-Einheiten zu monomeren Ringmolekülen oder oligomeren linearen Formen ligiert werden. Bedingt durch die Zirkularität oder die Kopf-Schwanz-Verknüpfung der linearen Formen könnten die ligierten PSTV-DNA-Einheiten in beiden Fällen als Matrize für die Synthese von oligomeren PSTV-RNAs dienen.

Eine Möglichkeit experimentell zu überprüfen, ob eine solche in vivo DNA-Ligation tatsächlich ablaufen kann, bestand darin, zwei geeignete, aber an sich nicht infektiöse subgenomische PSTV-DNA-Fragmente zu inokulieren, die erst nach Verknüpfung in vivo dem gesamten PSTV-Genom entsprechen. Passende Restriktionsschnittenden machen die DNA in besonderer Weise dazu geeignet, korrekt ligiert zu werden. Nur wenn diese DNA-Fragmente in der Tomatenpflanze zunächst zu monomeren DNA-Einheiten und daran anschließend zu monomeren Zirkeln oder oligomeren Formen kovalent verknüpft würden, ist eine Infektion zu erwarten. Ein anderer Weg der Infektionsauslösung scheidet aus, weil die beiden Fragmente an sich nicht infektiös sind, da ihnen jeweils ein Teil des PSTV-Genomes fehlt. Im Prinzip könnte eine Ligation zu einem gesamten PSTV-Genom auch im Anschluß an eine Transkription auf der RNA-Ebene stattfinden. Die Komplexizität eines solchen Vorgangs wäre im Vergleich zur Ligation der DNA jedoch viel zu groß.

Die entsprechenden Infektionsversuche ergaben, daß die subgenomischen Fragmente für sich alleine, wie erwartet, keine Infektion auslösen können, während die gemeinsame Inokulation zu Infektionen führt. Damit war nachgewiesen, daß eine Ligation zweier passender DNA-Fragmente in vivo möglich ist, sofern sie als ein Gemisch mechanisch in Tomatenpflanzen inokuliert wurden. Die spezifische Infektiosität dieser beiden subgenomischen PSTV-DNA-Fragmente, die im übrigen zur Sicherheit von Plasmiden isoliert wurden, die kein ganzes PSTV-Genom enthielten, war etwas geringer als diejenige der freigesetzten monomeren PSTV-DNAs. Das ist insofern verständlich, als im Falle der subgenomischen DNA-Fragmente mehrere Ligationsschritte erforderlich sind, um eine DNA-Matrize zu erzeugen, die zur Transkription von oligomerer PSTV-RNA geeeignet ist. Es ist erstaunlich, daß selbst ein solch komplizierter, eine ganze Serie von Enzymreaktionen benötigender und dazu in hohem Maße artifizieller Stoffwechselweg funktioniert und PSTV-Infektionen auslösen kann.

6.1.5 Infektiosität von monomeren und oligomeren PSTV-RNAs von (+) und (-) Polarität

Beim Biotest der mit Hilfe des SP6-Transkriptionssystems hergestellten PSTV-RNAs stellte sich heraus, daß die oligomeren (+) RNAs eine außerordentlich hohe spezifische Infektiosität besitzen. Bereits 1 ng dieser RNA-Transkripte pro Pflanze genügen, um eine PSTV-Infektion auszulösen. Etwa die gleiche Menge wird auch benötigt, um mit "natürlicher", d.h. aus infizierten Pflanzen aufgereinigter, monomerer zirkulärer PSTV-RNA Infektionen zu erzeugen. Dies bedeutet, daß die in vitro synthetisierten PSTV (+) RNAs in der Lage sind, ebenso effizient Infektionen hervorzurufen wie das in vivo synthetisierte Viroid.

Im Gegensatz zu den oligomeren PSTV (+) RNAs erwies sich die exakt monomere (+) RNA von Klon pSP-A1(-), ebenso wie ihre entsprechende DNA-Matrize als nicht infektiös. Dies beruht vermutlich darauf, daß sie nicht korrekt aus den sie umgebenden Vektorsequenzen herausgeschnitten werden kann. Das gleiche gilt übrigens auch für die monomere PSTV (-) RNA und die DNA des Klones pSP-A1(+).

Die Inokulation mit oligomeren PSTV (-) RNAs führte erst bei Mengen ab 10 ug und langer Inkubationszeit zur Symptomausprägung. Die oligomere (-) RNA ist dementsprechend um mindestens den Faktor 10.000 geringer infektiös als die vergleichbare oligomere PSTV (+) RNA. Die entsprechenden doppelsträngigen Plasmid-DNAs, die als Matrize für die Synthese von oligomeren PSTV (+) und (-) RNAs dienten, besitzen, wie die Infektionskontrolle ergab, beide die für oligomere DNA zu erwartende spezifische Infektiosität. Dies zeigt, daß tatsächlich die Polarität der inokulierten PSTV-RNAs für das unterschiedliche Infektionsverhalten von (+) und (-) RNA verantwortlich ist und nicht eine etwa auftretende Mutation in den entsprechenden DNA-Konstrukten.

Es erhob sich somit die Frage, ob die Infektionen, die nach der Inokulation von großen Mengen von PSTV (-) RNA-Transkripten beobachtet wurden, tatsächlich von RNAs mit (-) Polarität verursacht werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die SP6-RNA-Polymerase trotz ihrer außergewöhnlichen Spezifität für ihren eigenen Promotor, auch an anderen Stellen die Transkription initiieren kann, wengleich in sehr

geringem Maße. So ist von Melton et al. (1984) berichtet worden, daß sie unter Umständen auch den "falschen" Strang transkribiert, wobei ca 0,2 % fehlerhafte Transkripte entstehen. Man muß also davon ausgehen, daß die nach Inokulation mit PSTV (-) RNA-Transkripten aufgetretenen Infektionen letztendlich durch eine geringe Menge an oligomeren (+) RNA-Molekülen hervorgerufen wurden, die sich als "falsche" Syntheseprodukte unter den SP6-Transkripten befanden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß die Infektiosität geringer Mengen oligomerer PSTV (+) RNAs durch die Anwesenheit von oligomeren (-) RNAs keinesfalls beeinträchtigt wird. Da die spezifische Infektiosität der PSTV (-) RNAs um etwa den Faktor 10.000 niedriger liegt als bei den entsprechenden (+) RNAs, muß man allerdings folgern, daß die SP6-RNA Polymerase nicht, wie ursprünglich von Melton et al. aufgrund von molekularen Hybridisierungeversuchen berichtet, zu 0,2 % fehlerhaften Transkripten führt, sondern zu höchstens 0,01 %. Es ist allerdings unmöglich, auf direktem analytischen Wege, etwa durch molekulare Hybridisierung, eine solche Verunreinigung von einem PSTV (+) RNA-Molekül unter 10.000 Molekülen von (-) Polarität nachzuweisen oder gar zu quantifizieren. Bedingt durch den hohen Grad an Selbstkomplementarität der PSTV-RNA würde eine strangspezifische Hybridisierung, bei diesem krassen Mißverhältnis der Konzentrationen von (+) und (-) RNA, unweigerlich zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aus diesem Grunde kann die Anwesenheit der PSTV (+) RNA in der Präparation von PSTV (-) Transkripten auch nur indirekt, d.h. über die Infektiosität, geführt werden.

6.1.6 Warum sind die oligomeren PSTV (-) RNAs nicht infektiös ?

Die Beobachtung, daß die oligomeren PSTV (-) RNAs praktisch nicht infektiös sind, war in jeder Hinsicht unerwartet und überraschend, denn die Inokulationen mit jeder Art von artifiziellen, klonierten PSTV-DNA-Oligomeren, einschließlich der einzelsträngigen Form von (-) Polarität führten stets zu PSTV-Infektionen, obwohl die Viroid-Replikation normalerweise ohne DNA- Zwischenstufen erfolgt. Aus diesem Grunde konnte man eigentlich damit rechnen, daß die in vitro synthetisierten oligomeren PSTV (-) RNAs wesentlich besser geeignet sein würden, Infektionen auszulösen als zB die (-) DNAs, zumal die (-) RNAs während der Viroid-Replikation natürlicherweise auftreten. Sie wurden nicht nur in PSTV-infiziertem Gewebe nachgewiesen (Rohde und Sänger, 1981; Branch et al., 1981; Owens und Diener, 1982; Zelcer et al.,1982; Mühlbach et al., 1983), sondern sie dienen in isolierten Zellkernen auch als Matrize für die Synthese von PSTV (+) RNA (Spiesmacher et al., 1983, 1985). Daher erhebt sich die Frage, weshalb die oligomeren PSTV (-) RNAs, die mit Hilfe des SP6-Transkriptionssystemes synthetisiert wurden, nicht infektiös sind, während im Gegensatz dazu die SP6-RNAs von (+) Polarität die gleiche spezifische Infektiosität wie natürliche PSTV-RNA besitzen. Auch im Falle des HSV wurde beobachtet, daß RNAs von (-) Polarität von geringer spezifischer Infektiosität sind (Ohno et al., 1984). Diese HSV (-) RNAs wurden allerdings mit E.coli-RNA-Polymerase synthetisiert, die verglichen mit SP6-RNA-Polymerase weit weniger spezifisch ist. In einer späteren Arbeit berichteten die gleichen Autoren dann auch, daß die HSV (-) RNA überhaupt nicht infektiös ist (Ishikawa et al., 1984).

Man kann mindestens fünf Erklärungen diskutieren, worauf die fehlende Infektiosität der oligomeren PSTV (-) RNAs beruht :

(1) Die Fremdsequenzen am 5'- und 3'-Ende der SP6-PSTV (-) RNA-Transkripte stören nach der Inokulation die in vivo Transkription in (+) RNA. Dies wäre vergleichbar zu der Situation des Bromus Mosaik Virus (BMV) (Ahlquist et al., 1984) oder des Tabak Mosaik Virus (TMV) (Dawson et al., 1986; Meshi et al., 1986), bei denen Infektionen durch in vitro synthetisierte RNAs lediglich dann

erhalten werden, sofern die entsprechenden Transkripte ein korrektes 5'-Ende besitzen. Allerdings haben die Fremdsequenzen offenbar keinerlei störenden Einfluß auf die Infektiosität der oligomeren PSTV (+) RNAs und sie werden dabei nicht repliziert, sondern offenbar deletiert. Die Situation beim BMV und TMV ist insofern nicht mit der bei PSTV vergleichbar, da im letzteren Falle oligomere RNAs auf ihre Infektiosität getestet wurden. Nach der Inokulation von (-) RNA mit sechs PSTV-Einheiten sollte durch partielle Hydrolyse zumindest zu einem gewissen Anteil auch Fremdnukleotid-freie, aber dennoch oligomere (-) RNA entstehen, die dann in der Lage sein sollte, eine Infektion auszulösen. Dies spricht dafür, daß die Fremdsequenzen nur eine untergeordnete Rolle für die fehlende Infektiosität der PSTV (-) RNAs spielen.

(2) Nach der mechanischen Inokulation wird die oligomere PSTV (-) RNA in der pflanzlichen Zelle nicht genügend geschützt und/oder nicht korrekt transportiert, so daß sie den Ort der Transkription gar nicht oder zumindest nicht intakt erreicht. Wenn dies zutrifft, dann müßten die Proteine, mit welchen die Viroid-RNA in vivo assoziiert ist und die sie möglicherweise vor Degradation schützen und/oder sie transportieren, ausschließlich mit PSTV (+) RNA in Wechselwirkung treten.

(3) Die oligomeren PSTV (-) RNAs können im Gegensatz zu den oligomeren (+) RNAs nicht spezifisch zu Monomeren gespalten und anschließend zu Ringmolekülen ligiert werden. Dies würde bedeuten, daß sie wesentlich anfälliger für Exonukleasen wären, als die entsprechenden (+) RNAs. Wie jüngste Experimente zeigen, können oligomere PSTV (+) RNAs tatsächlich in monomere PSTV-RNA-Ringe überführt werden, sofern diese Oligomere in einem enzymatisch aktiven Extrakt aus Kernen von gesunden Kartoffel-Zellen inkubiert werden (Tsagris et al., zur Publikation eingereicht). Die entsprechende Reaktion mit den (-) RNA-Oligomeren führt zwar auch zu monomeren RNA-Zirkeln, allerdings läuft diese Reaktion mit erheblich verringerter Effektivität ab. Die praktisch fehlende Infektiosität der PSTV (-) RNAs könnte somit tatsächlich auf ihrer stark reduzierten Ligierbarkeit und der darauf

basierenden Exonuklease-Sensitivität beruhen.

(4) Die Effizienz der Transkription von (+) und (-) RNA könnte nach der Inokulation unterschiedlich sein. Aufgrund neuerer Untersuchungen muß angenommen werden, daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase II einerseits an der Transkription der PSTV (+) RNA in die (-) RNA beteiligt ist und daß sie andererseits auch diese (-) RNA wiederum zur (+) RNA transkribiert (Schindler et al., persönliche Mitteilung). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß zusätzlich noch andere RNA-Polymerasen am Replikationsprozeß des PSTV in vivo beteiligt sind, und daß die Transkriptionen in unterschiedlichen Kompartimenten des Zellkernes ablaufen. Als einen Hinweis auf die möglicherweise unterschiedliche nukleäre Kompartimentierung von PSTV (+) und (-) RNA könnte man die Tatsache werten, daß die PSTV (+) RNA vorwiegend mit dem Nukleolus assoziiert ist (Schuhmacher et al., 1983). Der bevorzugte Ort der PSTV (-) RNA innerhalb des Zellkernes konnte allerdings noch nicht lokalisiert werden.

(5) Die inokulierten PSTV (-) RNAs können schließlich zu keinerlei Infektionen führen, da sie nicht mit der komplementären (+) RNA komplexiert sind. So haben Hadidi et al. (1981) berichtet, daß die natürlicherweise auftretenden oligomeren PSTV (-) RNAs nur in Duplex-Form vorkommen und nicht als freie Moleküle existieren können.

Drei der fünf aufgeführten möglichen Ursachen für die Nicht-Infektiosität der PSTV (-) RNA beruhen letztlich darauf, daß diese aus verschiedenen Gründen vergleichsweise instabiler ist als ihre komplementäre (+) Form. Aus dieser Überlegung heraus wurde versucht, die oligomere (-) RNA vor ihrer Inokulation besser vor Abbau zu schützen. Oligomere PSTV (-) RNA die am 5'-Ende mit einer "Cap"-Struktur geschützt wurde, führte bereits bei einer Menge von 1 ug pro Pflanze in zwei Fällen zur Infektion. Da diese Versuche aus technischen Gründen nicht weiter ausgedehnt werden sollten, muß es allerdings sehr fraglich bleiben, ob es sich hierbei um einen wirklich

signifikanten Effekt handelt.

Schließlich sollte noch überprüft werden, ob die Komplexierung mit PSTV (+) RNAs einen stimulierenden Effekt auf die Infektionsfähigkeit der (-) Oligomeren hatte. Aus diesem Grunde wurden die PSTV (-) RNAs zusammen mit kurzen und daher an sich nicht infektiösen PSTV (+) RNAs inokuliert, wobei sowohl eine einfache Mischung, als auch vorher hybridisierte Proben verwendet wurden. Tatsächlich konnten auf diese Weise Infektionen erhalten werden. Die Anzahl der infizierten Pflanzen war jedoch noch immer relativ gering und korrelierte nicht in vorhersehbarer Weise mit der Art und Länge der für diese Experimente benutzten nicht infektiösen (+) RNA-Fragmente. Dies schränkt die Aussagekraft dieser Infektionsversuche relativ stark ein, zumal man in diesem Falle auch andere Erklärungsmöglichkeiten für die beobachteten Infektionen finden kann. Es ist nämlich denkbar, daß die subgenomischen PSTV (+) RNAs, die an das oligomere PSTV (-) Molekül binden, letztere als Matrize benutzen können. An dieser Matrize könnten dann oligomere PSTV (+) RNAs synthetisiert werden, die dann den eigentlichen Infektionsprozeß in Gang setzen. Würde dieses Experiment mit (+) und (-) RNAs verschiedener PSTV-Isolate wiederholt, dann ließe sich anhand der Nachkommenschaft möglicherweise entscheiden, über welchen Mechanismus die beobachteten Infektionen verursacht werden.

Tabelle 10 :
Übersicht über das Inkektionsverhalten verschiedener PSTV-DNAs und PSTV-RNAs

	monomere Form	oligomere Form
Einzelstrang-DNA (+) Polarität	+/ + +[a]	+ + +
Einzelstrang-DNA (-) Polarität	-	+ + +
Doppelstrang-DNA Vektor-insertiert	-/ +[a]	+ + +
Doppelstrang-DNA herausgeschnitten	+ + +	+ + +
RNA (+) Polarität	-/ + + +[b]	+ + +
RNA (-) Polarität	-	-/ +[c]

+++ : alle Testpflanzen entwickeln die PSTV-Krankheitssymtome in etwa der gleichen Zeit wie nach der Inokulation mit einer oligomeren RNA;
++ : alle oder nahezu alle Testpflanzen entwickeln PSTV-Symptome, jedoch erst nach längerer Latenzzeit;
+ : nur einige Testpflanzen entwickeln PSTV-Symptome;
- : Keine der Testpflanzen entwickelt PSTV-Symptome.
[a] : Unterschiedliches Verhalten bei unterschiedlichen Konstrukten;
[b] : Starke Infektiosität bei nahezu monomeren PSTV-RNAs mit kurzen duplizierten Bereichen innerhalb der "oberen zentralen konservierten Region;
[c] : Infektionen nicht mit Sicherheit durch (-) RNA hervorgerufen, sondern möglicherweise durch (+) RNA-Kontaminationen;

6.1.7 Modell des PSTV-Infektionsweges nach mechanischer Inokulation von klonierten PSTV-DNAs und ihren RNA-Transkripten

Tabelle 10 zeigt die in allgemeiner Form zusammengefaßten Resultate der verschiedenen Infektionsstudien. Werden die bereits diskutierten Infektionsdaten im Zusammenhang betrachtet, so läßt sich eine Vorstellung darüber gewinnen, wie die verschiedenen Formen von klonierter PSTV-DNA und die davon abgeleiteten RNAs die Viroid-Infektion nach mechanischer Inokulation in Gang setzen können.

Wie die Infektionsexperimente mit SP6-PSTV-RNA gezeigt haben, ist die (+) RNA das eigentliche infektiöse Agens, welches verantwortlich ist, für die Verbreitung innerhalb der Pflanze und im Bestand. Die (-) RNA ist in diesem Sinne inaktiv. Daraus muß man schließen, daß die verschiedenen PSTV-DNAs nur deshalb infektiös sind, weil sie offenbar in vivo zu den entsprechenden RNAs von (+) Polarität transkribiert werden können. Da aber die PSTV-DNAs den eigentlichen Replikationsmechanismus erst nach einer enzymatischen Reaktion in Gang setzen können, ist es verständlich, daß sie eine geringere spezifische Infektiosität als die PSTV (+) RNA besitzen müssen.

Ausgehend von einzelsträngiger DNA könnte die Bildung von PSTV (+) RNA allenfalls bei der (-) DNA-Form in einer direkten Transkription erfolgen. Da aber die spezifischen Infektiositäten der einzelsträngigen DNAs beider Polaritäten gleich sind, muß man annehmen, daß die Transkription in (+) RNA erst nach Ergänzung der Einzelstrang-Form zum Doppelstrang erfolgt. In Übereinstimmung mit der zusätzlich erforderlichen enzymatischen Reaktion ist daher die spezifische Infektiosität der einzelsträngigen DNA gegenüber der Doppelstrang-Form um ein Weiteres verringert.

Bei allen Infektionsstudien, gleichgültig ob sie mit einzel- oder doppelsträngiger PSTV-DNA oder mit PSTV (+) RNA durchgeführt wurden, war festzustellen, daß die oligomeren Formen sich als erheblich stärker infektiös erwiesen als die monomeren Formen, die von Fremdsequenzen umgeben sind. Erst die Freisetzung der monomeren doppelsträngigen DNA führte zu einer Steigerung der spezifischen Infektiosität. Durch den Biotest mit den gemischten subgenomischen DNA-Fragmen-

ten wurde nachgewiesen, daß die DNA-Fragmente in vivo ligiert werden können. Die Verfügbarkeit von oligomeren Formen und damit letztendlich von oligomerer PSTV (+) RNA, scheint daher eine weitere Voraussetzung für die Infektionsauslösung zu sein. Eine vergleichbare Situation existiert bei DNA-Viren mit doppelsträngigem zirkulärem Genom. So erwiesen sich im Falle von Polyoma Virus (Chan et al., 1979; Fried et al., 1979), Simian Virus 40 (Schaffner, 1980) oder Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) (Howell et al., 1980; Lebeurier et al., 1980, 1982) Kopf-Schwanz-verknüpfte doppelsträngige DNA-Oligomere als infektiös, ohne daß sie aus ihrer Vektor-DNA freigesetzt wurden. Ähnlich wie bei PSTV sind diese monomeren viralen DNAs jedoch erst nach dem Herausschneiden mit Restriktionsenzymen infektiös. Auch die klonierte DNA des Cassava Latent Virus (CLV), das als Vertreter der pflanzlichen Geminiviren zur Gruppe der einzelsträngigen DNA-Viren mit bipartitem Genom gehört, verhielt sich in gleicher Weise (Stanley, 1983).

Bei allen diesen viralen und subviralen Pathogenen mit zirkulärem Genom muß offenbar zu einer Infektionsauslösung nach der Inokulation zunächst eine zirkuläre Nukleinsäure in vivo gebildet werden, wie sie normalerweise vorkommt. Zur Bildung von solchen Ringmolekülen sind oligomere lineare Formen besonders gut geeignet, da sie auch natürlicherweise als Vorläufermoleküle für diese Ringe fungieren. Im Falle von PSTV bedeutet dies, daß sowohl die direkt inokulierte oligomere (+) RNA, als auch die nach der Inokulation in vivo durch Transkription von DNA erzeugte oligomere PSTV (+) RNA an spezifischer Stelle geschnitten werden muß. Die auf diese Weise freigesetzte monomere lineare RNA wird anschließend zum Ringmolekül ligiert. Diese RNA-Ringe initiieren dann die PSTV-Replikation und damit die Viroid-Infektion. Angesichts des unterschiedlichen Infektionsverhaltens von monomeren und oligomeren PSTV-DNAs und PSTV-RNAs muß man schließen, daß eine solche "Prozessierungsreaktion" zu einer monomeren zirkulären PSTV-RNA offenbar in jedem Falle nötig ist, um eine PSTV-Infektion auszulösen.

Die mit verschiedenen Ausgangsmaterialien erzielten PSTV-Infektionen liefen demzufolge höchstwahrscheinlich über den in Abb. 18 skizzierten Weg ab. Nach diesem Modell ist die Prozessierbarkeit der PSTV (+) RNA von entscheidender Bedeutung für ihre Infektiosität. Aus diesem Grunde wurden die strukturellen Voraussetzungen für die Prozessierbarkeit der PSTV-RNA näher analysiert.

Modell für die Induktion einer Viroid Infektion

durch klonierte cDNA oder durch in vitro synthetisierte RNA Transkripte

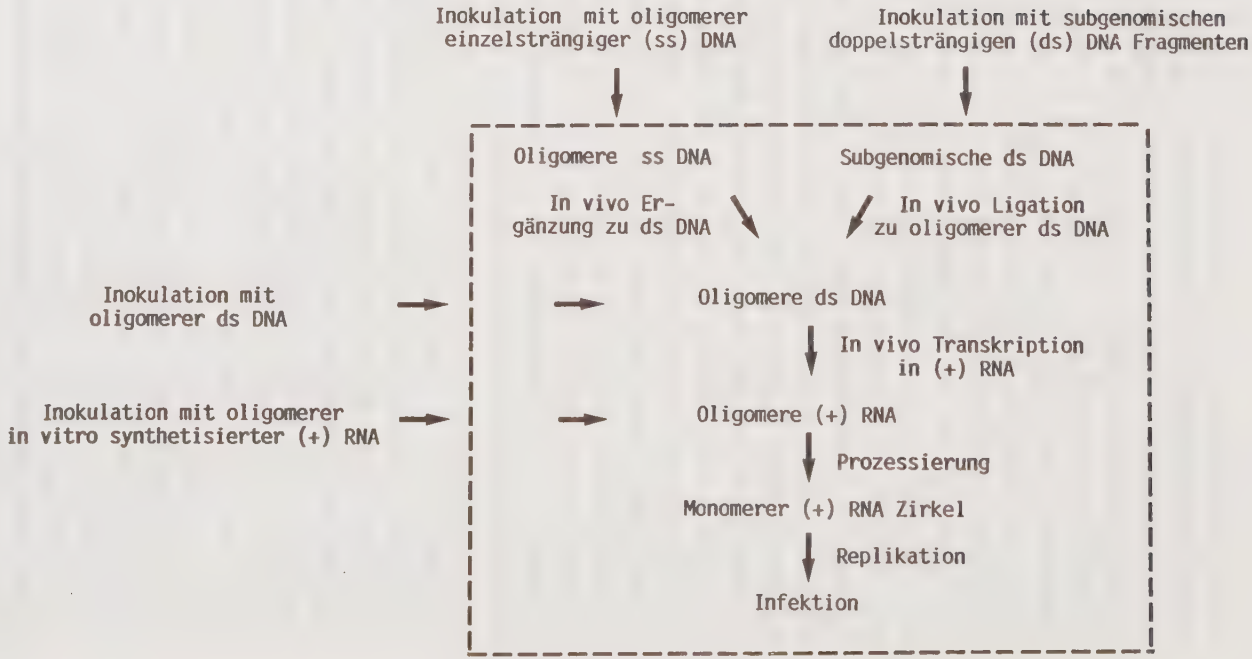


Abbildung 18:
Schematische Darstellung der möglichen Infektions-Auslösung durch verschiedene gentechnolgisch gewonnene Formen von PSTV-DNA und PSTV-RNA.

Die in der umrandeten Fläche ablaufenden Prozesse finden in den inokulierten Pflanzen statt. Dieses Modell basiert im wesentlichen auf folgenden Beobachtungen :

(1) Die PSTV (+) RNA ist das Agens mit der höchsten spezifischen Infektiosität.

(2) Die Inokulation von PSTV-DNA induziert die Replikation der PSTV-RNA.

(3) Einzelstrang-DNAs von (+) und (-) Polarität sind gleich stark infektiös, wohingegen PSTV (-) RNA nicht infektiös ist.

(4) Einzelstrang-DNA und eine Mischung von subgenomischen Fragmenten besitzen eine geringere spezifische Infektiosität als oligomere Doppelstrang-DNA.

(5) Monomere Formen von PSTV-RNA und -DNA sind von wesentlich geringerer spezifischer Infektiosität als oligomere Formen.

Der Vergleich der spezifischen Infektiositäten erlaubt einen Rückschluß auf das dargestellte Fließschema. Die Tatsache, daß in allen Fällen die Inokulation von oligomeren Formen leichter zu Infektionen führt läßt sich damit erklären, daß diese Formen leichter zu zirkulären Molekülen prozessiert werden können. Gemäß diesem Modell ist die in vivo Bildung einer monomeren zirkulären Viroid (+) RNA der sogenannte "Flaschenhals" im Verlauf der Induktion eines Viroid-Replikations- und Infektionsprozesses durch eine mechanisch inokulierte, klonierte bzw transkribierte artifizielle Nukleinsäure mit Viroidsequenzen.

6.2 Analyse der Bereiche des PSTV-Genoms, die zur Prozessierbarkeit und Infektionsfähigkeit dupliziert sein müssen

6.2.1 Die Prozessierung der PSTV-RNA

Die Bildung der zirkulären monomeren Viroid-RNA-Moleküle aus langen oligomeren RNA-Vorstufen, welche in Viroid-infiziertem pflanzlichen Gewebe nachgewiesen wurden (Spiesmacher et al., 1983; Branch und Robertson, 1984; Ishikawa et al., 1984; Hutchins et al.; 1985), geschieht in vivo in einer sogenannten "Prozessierungsreaktion", über deren Details bislang noch keine experimentellen Daten vorliegen. Es wurde jedoch bereits durch in vitro Versuche festgestellt, daß RNA-Ligasen pflanzlicher Herkunft, nämlich aus Weizenkeim und aus Chlamydomonas, die natürlich vorkommende lineare PSTV-RNA zu Ringmolekülen ligieren können (Kikuchi et al., 1982; Branch et al., 1982). Wie die biochemische Analyse ergab, verknüpfen diese Ligasen solche RNA-Termini, die am 3'-Ende ein 2',3'-cyclo-Phosphat und am 5'-Ende ein 5'-Phosphat besitzen (Konarska et al., 1981; 1982; Filipowicz und Gross, 1984). Außerdem sind auch freie 5'-OH Enden nach Phosphorylierung durch die RNA-Ligase zur Verknüpfung geeignet. Durch die Ligation wird eine 2'- Phosphomonoester 3',5'-Phosphodiester-Bindung gebildet.

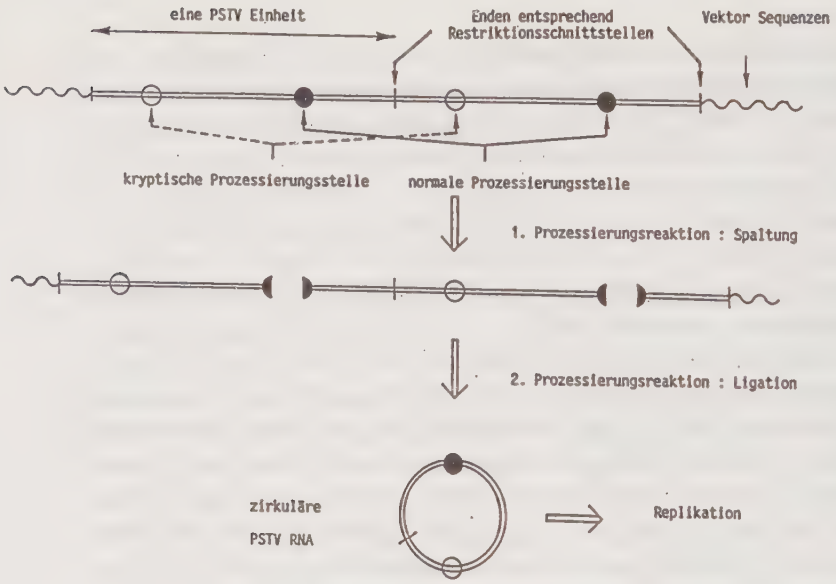
Es ist in diesem Zusammenhang von Interesse darauf hinzuweisen, daß bei Infektiositätsstudien mit monomerer linearer PSTV-RNA, die durch artifizielles "Nicking" von monomeren PSTV-RNA-Zirkeln hergestellt wurde, lediglich die lineare RNA mit 2',3'-cyclo-Phosphatresten sich als infektiös erwies (Hashimoto et al., 1985). Dabei war es gleichgültig, an welcher Stelle die zirkuläre PSTV-RNA linearisiert worden war. Eine RNA mit den genannten Enden entspricht somit genau derjenigen, die von der RNA-Ligase des Weizenkeimtypes verknüpft werden kann. Dieser Sachverhalt spricht sehr stark dafür, daß eine ähnliche RNA-Ligase wie die aus Weizenkeim auch an der Prozessierungsreaktion der Viroid (+) RNA beteiligt ist.

Ein weiteres noch ungeklärtes Problem bildet die Frage, an welcher Stelle innerhalb des PSTV-Genomes die oligomeren (+) RNAs zu monomeren

Formen "zurechtgeschnitten" werden. Es wurde zwar festgestellt, daß die natürlicherweise auftretenden linearen PSTV-RNAs "Brüche" zwischen den Nukleotiden C_{181} und A_{182} bzw C_{348} und A_{349} besitzen (Kikuchi et al. 1982). Die Autoren räumten allerdings ein, daß es sich dabei um eine nachträglich aus der zirkulären RNA entstandene lineare Form handeln könnte und somit nicht um echte Vorläufermoleküle der zirkulären PSTV-RNA, da die "Schnittstellen" in beiden Fällen durch Trennung einer C-A Bindung hervorgerufen wurden, die von allen Bindungstypen am schwächsten ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, mit Hilfe von Infektionsstudien den "funktionellen" Ort herauszufinden, an welchem die oligomere PSTV (+) RNA geschnitten und die dabei entstehenden Monomere zirkularisiert werden. Damit eine korrekte monomere PSTV-RNA freigesetzt werden kann, muß der funktionelle Bereich zweimal vorhanden sein, was bedeutet, daß er durch eine PSTV-RNA-Einheit voneinander getrennt ist. Diese Voraussetzung ist zwangsläufig in jedem beliebigen dimeren Kopf-Schwanz-verknüpften PSTV-RNA-Molekül vorhanden. In einer partiell duplizierten RNA allerdings hängt es davon ab, ob der Ort der Linearisierung und anschließenden Zirkularisierung im partiell duplizierten Bereich liegt, wie dies aus Abb. 19 hervorgeht. Da die Infektiosität einer gegebenen PSTV-RNA als ein indirektes Maß für ihre Prozessierbarkeit angesehen werden kann, läßt sich durch vergleichenden Biotest von verschiedenen partiell duplizierten PSTV-RNAs herausfinden, an welcher Stelle des Genomes die PSTV-RNA prozessiert wird. Es wurde dabei davon ausgegangen, daß je nach Art der Duplikation die partiell duplizierten Moleküle sich entweder als in gleichem Maße infektiös erweisen würden wie die entsprechenden Oligomere oder daß sie zu einer reduzierten Infektiosität führen würden, bzw daß sie überhaupt nicht mehr infektiös sind (siehe Abb. 19).

Prozessierung einer dimeren PSTV-RNA



Prozessierungsverhalten von partiell duplizierter PSTV-RNA

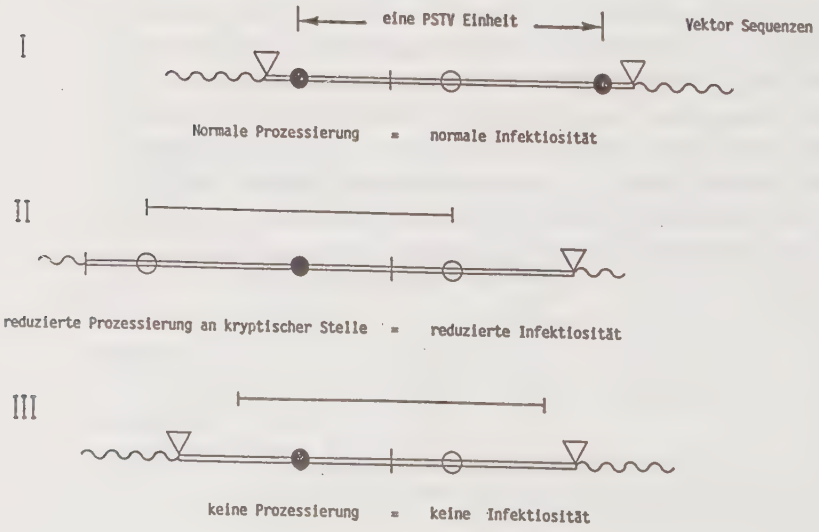


Abbildung 19: Modell über die Prozessierbarkeit verschiedener in vitro erzeugter PSTV-RNA-Transkripte.

Der **obere Teil** der Abbildung zeigt in schematischer Weise die bei einem dimeren Konstrukt auftretenden Verhältnisse der RNA-Prozessierung. Jede monomere PSTV-RNA-Einheit beinhaltet zwangsläufig den Ort der Prozessierungsreaktion (symbolisiert durch einen schwarzen Kreis). Die relative Lage dieser Prozessierungsstelle auf der monomeren PSTV-Einheit hängt davon ab, welches Nukleotid des ursprünglich zirkulären PSTV-Moleküles das 5'-Ende einer linearen monomeren Einheit bildet. Es ist jedoch offensichtlich, daß in einem Kopf-Schwanz-verknüpften dimeren Konstrukt die Prozessierungstelle zweimal auftritt und zwar im Abstand einer Genomlänge. Deshalb kann aus jeder dimeren RNA eine monomere PSTV-RNA-Einheit herausgeschnitten und zirkularisiert werden. Möglicherweise können diese beiden Prozessierungsreaktionen auch gekoppelt sein. Die verbleibenden Viroidsequenzen bleiben mit der Vektor-DNA verknüpft und können keinen Infektionsprozeß initiieren, weil es sich bei ihnen jeweils um subgenomische und daher nicht-infektiöse Viroid-Fragmente handelt. Dieses Modell erklärt nicht nur, weshalb dimere Konstrukte zu Infektionen führen, sondern auch, weshalb die flankierenden Vektorsequenzen nicht stören. Es ist denkbar, daß die Prozessierung der PSTV-RNA an mehreren Stellen ablaufen kann und daß demzufolge ein kryptischer Prozessierungsort existiert (oder sogar mehrere). Eine solche mögliche kryptische Prozessierungsstelle ist durch einen weißen Kreis gekennzeichnet.

Der **untere Teil** der Abbildung gibt die Verhältnisse bei PSTV-RNAs wieder, deren Größe sich zwischen einer und zwei vollen PSTV-RNA-Einheiten bewegt. Es handelt sich dabei also um partiell duplizierte Konstrukte, bzw um partiell deletierte dimere PSTV-RNAs. Die Prozessierbarkeit und damit auch die Infektiosität dieser RNAs wird davon abhängen, ob die partiell duplizierte Region die normale, die kryptische oder keine Prozessierungsstelle beinhaltet. Diese drei Fälle sind im unteren Teil skizziert. Dabei ist insbesondere zu beachten, daß auch eine RNA, die kaum länger ist als eine monomere RNA, die volle Prozessierungsaktivität besitzen kann (I), wohingegen wesentlich längere RNAs nur eine reduzierte (II) oder sogar gar keine Prozessierungsaktivität aufweisen können (III).

6.2.2 Infektionstests mit PSTV-RNAs mit langen duplizierten Bereichen

Der Biotest mit der SP6-RNA von Klon pSP-Av1.8(-), der im Bereich der Nukleotide 282-(359/1)-223 dupliziert ist, hatte ergeben, daß diese 1,8fache (+) RNA so stark infektiös ist, wie die mehrfach oligomeren (+) RNAs. Auch die entsprechende Doppelstrang-DNA war stark infektiös. Im Gegensatz dazu führte die 1,2fache DNA von Klon pSP-Av1.2(+), bei welcher der Bereich der Nukleotide 221-281 dupliziert war, nur in hoher Konzentration zu einigen Infektionen. Aus diesen Infektiositätsdaten wurde geschlossen, daß die Prozessierungsstelle im Bereich der Duplikation von Klon pSP-Av1.8(-) liegen muß. Durch systematische Verkürzung der Duplikation dieses Plasmides in der pA1-Serie wurde festgestellt, daß ein bestimmtes Konstrukt mit hoher Effizienz Infektionen nur dann hervorruft, wenn der Bereich der "oberen zentralen konservierten Region", welcher bei allen Viroiden mit Ausnahme des ASBV hoch konserviert vorliegt, in duplizierter Form vorhanden ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Infektiositäten der RNA-Transkripte, die von den Plasmiden pBa281 und pBs281 synthetisiert wurden. Außerdem lassen sich diese Ergebnisse sehr gut mit der Beobachtung korrelieren, daß im Vergleich zu anderen monomeren DNAs die spezifische Infektiosität der ss und ds DNA von Klon M13-40(+) mit einer Duplikation von 11 Nukleotiden im Bereich der zentralen konservierten Region deutlich höher ist. Weiterhin stimmt diese Beobachtung auch mit einer Infektiositätsstudie über partiell duplizierte HSV-DNA von Meshi et al. (1985) überein, bei der ebenfalls festgestellt wurde, daß die zentrale konservierte Region der Viroide für die Infektiosität und damit sehr wahrscheinlich für die Prozessierbarkeit der Viroid-RNA eine wichtige Rolle spielt.

6.2.3 Infektionstests der PSTV-RNAs mit kurzen duplizierten Bereichen

Der Infektiositätstest der SP6-RNA-Transkripte von Klon pHa106 zeigte, daß eine Duplikation der zentralen konservierten Region der 22 Nukleotide 85-106 des PSTV ausreicht, um die gleiche hohe spezifische Infektiosität zu erzeugen, wie sie oligomere RNAs aufweisen. Diese Beobachtung legt nahe, daß die Prozessierungsreaktion tatsächlich

innerhalb der genannten Region abläuft. Die genauere Lokalisation bereitete allerdings Schwierigkeiten. So konnte bereits durch Duplikation der Nukleotide 102-106 Infektionen beobachtet werden, die in noch höherem Maße auftraten, wenn die sechs Nukleotide zwischen den Positionen 83-88 dupliziert wurden. Es blieb allerdings unverständlich, weshalb die im Vergleich dazu um 9 Nukleotide längere RNA von Plasmid pHa97 nur sehr schwach infektiös ist. Da entsprechende Kontrollversuche (Tabelle 8c) ergeben hatten, daß die Fremdsequenzen am 3'-Ende für dieses Verhalten nicht verantwortlich sind, könnte man vermuten, daß die PSTV-spezifische Sequenz CCCCGGG am 3'-Ende Sekundärstruktureffekte auslöst, die störend auf die Infektiosität wirken.

Die Prozessierungsreaktion im Bereich der Nukleotide 83-88

Die hohe spezifische Infektiosität der RNA-Transkipte von Plasmid pHa88 zeigte, daß die Prozessierung innerhalb der 6 duplizierten Nukleotide der Position 83-88 in diesem Konstrukt mit hoher Effizienz und Präzision möglich ist. Eines der Ziele der Mutageneseexperimente war es, durch Basenaustausche an dieser Prozessierungsstelle einen drastischen Rückgang der Infektiosität zu erzeugen. Dazu wurde jeweils entweder nur am 5'-Ende (SS-Serie) oder nur am 3'-Ende (DD-Serie) mutagenisiert. Abgesehen von dem Konstrukt DD5, bei dem die erzeugte Mutation allerdings außerhalb des duplizierten Bereiches lag, war nur eine graduelle Reduktion der spezifischen Infektiosität zu beobachten, nicht aber ein massiver Rückgang, wie er eigentlich erwartet wurde. Dieses Ergebnis besagte zunächst lediglich, daß die eingeführten Mutationen die Prozessierungsreaktion nicht erheblich behinderten. Durch die Sequenzanalyse der PSTV-Nachkommenschaft, die durch die entsprechenden RNA-Transkripte der mutierten DNAs erzeugt wurden, bestand noch immer die Möglichkeit, den Ort der Prozessierungsreaktion zu lokalisieren, wie an einem theoretischen Beispiel erläutert werden soll.

Zur Verdeutlichung des Sachverhaltes soll zB angenommen werden, daß die monomere PSTV-RNA in vivo durch einen Schnitt zwischen den Nukleotiden G_{86} und G_{87} aus der SP6-RNA von Klon pHa88 freigesetzt wird. Es soll weiterhin angenommen werden, daß weder die Mutation des Nukleotides 86 bei der Mutante SS4, SS5 und DD2 noch eine andere Mutation

einen Einfluß auf die Spaltung der Bindung zwischen Nukleotid 86 und 87 und die anschließende Zirkularisierung besitzt. In diesem hypothetischen Falle würde man erwarten, daß die Mutanten RNAs SS1 - SS5, sowie die RNA von Mutante DD1 zu einer nicht mutierten PSTV-Nachkommenschaft führen. In den genannten Fällen läge die eingeführte Mutation außerhalb des für die zirkuläre RNA "genutzten" Bereiches. Die Nachkommenschaft aller übrigen RNAs sollte die jeweiligen Basenaustausche aufweisen, da sie innerhalb des zirkularisierten Bereiches liegen. Die Sequenzierung der PSTV-Nachkommenschaft von SS1, SS4, SS6, DD1 und DD4 ergab jedoch, daß nach Inokulation mit der RNA all dieser Mutanten nur "Wildtyp"-PSTV nachzuweisen war. Dieser Befund stimmt weder mit der Annahme einer Spaltung zwischen den Nukleotiden G_{86} und G_{87} überein, noch mit einer anderen spezifischen Spaltung innerhalb der fraglichen sechs Nukleotide. Die experimentellen Daten können nun auf zwei Arten interpretiert werden :

Erstens ist es möglich, daß die Prozessierungsreaktion an mehreren Stellen innerhalb der Duplikation von 6 Nukleotiden stattfinden kann, weil die Spezifität der Prozessierung aufgrund der Duplikation von nur 6 Nukleotiden veringert wird.

Zweitens ist es vorstellbar, daß die entstandenen PSTV (+) RNA-Ringmoleküle im Verlaufe der Replikation aufgrund eines starken Selektionsdruckes zu "Wildtyp"- PSTV revertieren. Wie das Beispiel der RNA von Mutante SS7 zeigt, ist die Annahme einer Reversion durchaus berechtigt. Der Basenaustausch A_{89} nach U_{89} in SS7 liegt außerhalb des duplizierten Bereiches. Konsequenterweise muß die Prozessierungsreaktion, ganz gleich wo sie innerhalb der 6 duplizierten Nukleotide abläuft, zu einer zirkulären RNA führen, welche die Mutation U_{89} trägt. Die Nachkommenschaft dieser RNA besitzt jedoch das Wildtyp A_{89} und ist folglich revertiert. Andererseits kann bei der in ähnlicher Weise mutierten RNA von Klon DD5, die nicht infektiös ist, nicht eindeutig entschieden werden, ob die Prozessierungsreaktion gestört ist, oder ob das möglicherweise doch entstehende zirkuläre RNA-Molekül nicht zur Replikation und Reversion befähigt ist.

Die Infektiositätsstudien mit den im Bereich zwischen Nukleotid 83 - 88 mutierten PSTV-RNAs brachten also keinen weiteren Aufschluß über die genaue Prozessierungsstelle innerhalb der oligomeren RNAs.

Angesichts der weitgehend konservierten Sequenz der verschiedenen PSTV Isolate mit ihrer einheitlichen Kettenlänge von 359 Nukleotiden (Schnölzer et al., 1985) muß man davon ausgehen, daß die Prozessierung der PSTV-RNA eine hochspezifische Reaktion und kein zufälliges Ereignis ist. Obwohl die Infektiositätsdaten und auch neuerdings die Resultate der in vitro Prozessierung von PSTV-RNAs in nukleären Extrakten (Tsagris et al., zur Publikation eingereicht) eindeutig zeigen, daß die zentrale konservierte Region der Viroide an der Prozessierung beteiligt ist, sind noch eine ganze Reihe weiterer Experimente erforderlich, um den Mechanismus der Reaktion im Detail zu verstehen. So hat Diener (1986) darauf hingewiesen, daß die zentrale konservierte Region der Viroide aufgrund des hohen Grades an Selbstkomplementarität innerhalb dieser Moleküldomäne eine eigentümliche Sekundärstruktur annehmen kann, sobald sie in duplizierter Form vorliegt. Basierend auf dieser Struktur haben theoretische Überlegungen, sowie erste Messungen physiko-chemischer Eigenschaften der verschiedenen SP6-RNA Transkripte (die in Kollaboration mit Herrn Dr. Steger aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Riesner in Düsseldorf durchgeführt wurden) ergeben, daß die Prozessierungsreaktion unter Umständen nicht wie bisher angenommen intramolekular verläuft, sondern, daß zwei RNA-Moleküle über ihre konservierte Region wechselwirken können, so daß es sich bei der PSTV-Prozessierungsreaktion höchstwahrscheinlich um eine bimolekulare Reaktion handelt. In Anbetracht dieses noch vorläufigen Modells der Beteiligung zweier RNA-Moleküle an der Prozessierung erscheint es wahrscheinlich, daß die vorhandenen Infektiositätsdaten von RNAs mit relativ kurzen duplizierten Bereichen neu interpretiert werden können. Auf diese Weise werden dann auch möglicherweise einige scheinbare Ungereimtheiten, wie zB das Verhalten der mutierten RNAs oder die fehlende Infektiosität der RNA von Klon pHa97 verständlich. Die ersten Experimente zur Überprüfung dieses Modells sind gegenwärtig im Gange.

6.2.4 Untersuchungen über den Einfluß von Punktmutationen auf Replikation und Pathogenität von PSTV-RNA

Viroide sind trotz ihrer fehlenden mRNA Eigenschaften in ihrer Primärstruktur stark konservierte RNAs. Dieser Sachverhalt ist insofern

überraschend, da sich die Viroide nur über den RNA - RNA Weg replizieren und folglich von RNA-Polymerasen synthetisiert werden, von denen bekannt ist, daß sie eine Fehlerrate in der Größenordnung von 10^{-3}-10^{-4} besitzen (vergl. Hollander et al., 1982). Wenn es keinen starken Selektionsdruck hinsichtlich der Replikabilität gäbe, dann müßte die Sequenz eines Viroides sehr schnell uneinheitlich werden.

Inzwischen sind die Sequenzen einer großen Anzahl von verschiedenen Isolaten des PSTV (Gross et al., 1978, 1981; Schnölzer et al., 1985) und des CEV (Gross et al., 1982; Visvader and Symons, 1983, 1985) bestimmt worden. Dabei zeigte sich, daß nur eine limitierte Anzahl von Änderungen zu beobachten ist und daß die beiden Viroid-Arten sich im Grade ihrer Flexibilität unterschiedlich verhalten. So wurden im Falle des CEV mittlerweile 17 natürlich auftretende Sequenzvarianten nachgewiesen, die in ihrer Kettenlänge (370-375 Nukleotide) variieren (Visvader und Symons, 1985). Die beobachteten Mutationen treten jedoch hauptsächlich in zwei bestimmten Domänen des CEV-Moleküles auf. Die verschiedenen Isolate von PSTV sind im Vergleich zu CEV noch stärker konserviert. So wurden bislang nur PSTV-Varianten mit einer Kettenlänge von 359 Nukleotiden gefunden, wobei die Zahl der Basenaustausche zwischen den verschiedenen Isolaten sehr gering ist. Jedoch bewirken diese geringfügigen Änderungen auf molekularer Ebene die nachhaltige Änderungen des Symptombildes einer PSTV-infizierten Tomatenpflanze. Auf empirische Weise konnte das Ausmaß der Pathogenität eines bestimmten PSTV-Isolates auf seine Wirtspflanze mit der thermodynamischen Stabilität eines bestimmten Bereiches des PSTV-Moleküles korreliert werden (Schnölzer et al., 1985). Diese sogenannte "Virulenz-modulierende Region" (VM-Region) reicht von Nukleotid 42 bis 60 im oberen Strang bzw von Nukleotid 299 bis 319 im unteren Strang des Sekundärstrukturmodells. Bei den verschiedenen PSTV-Isolaten sind die Basenaustausche nahezu ausschließlich in der VM-Region zu finden. Nur in all jenen Fällen, bei denen innerhalb der VM-Region ein Nukleotid deletiert ist, tritt eine kompensatorische, d.h. die ursprüngliche Kettenlänge wieder herstellende Insertionsmutation bei Nukleotid 120/121 auf. Diese Position liegt in der "rechten" Hälfte des stäbchenförmigen Moleküls.

Da die Prinzipien der Evolution, d.h. der Mutation und der sich anschließenden Selektion, auch auf molekularer Ebene gültig sind, läßt

sich die weitgehende Konservierung der Primärstruktur des PSTV und auch des CEV entsprechend erklären. In Viroid-infizierten Pflanzen läuft eine Unzahl von Replikations-Zyklen ab, bei den neben den optimal adaptierten Viroid-Molekülen eines Isolates eine ganze Reihe von mutierten Molekülen synthetisiert werden. Die permanent wirksame Selektion sorgt stets wieder für das "Überleben" der replikationsfähigsten, d.h. der am besten adaptierten Moleküle. Weiterhin kann man davon ausgehen, daß solche Moleküle mutativ kaum noch zu verbessern sind und daß die auftretenden Mutationen die Replikationsfähigkeit und somit die "Fitness" der Viroid-RNA auf dreierlei Weise beeinflussen :

(1) Die Mutation ist für die Viroide "letal", weil die veränderte Viroid-RNA nicht mehr replikationsfähig ist. Eine solche Mutante wird sofort ausselektioniert und ist daher in einer Population von Viroid-RNAs nicht nachweisbar.

(2) Die Mutation ist für die Viroid-RNA nachteilig, weil ihre Replikationsrate, verglichen zur Ausgangssequenz, vermindert wird. Je nach Grad der Verminderung der Replikationsfähigkeit kann eine solche Mutante verschieden lange in einer Population überleben, bevor sie von einer besser adaptierten Variante verdrängt wird.

(3) Die Mutation bleibt ohne Einfluß auf die Replikabilität und Infektiosität. In diesem Falle kann eine stabile gemischte Viroid-RNA-Population entstehen.

Alle bisher gefundenen und somit natürlicherweise auftretenden Nukleotidaustausche bei verschiedenen Isolaten einer Viroid-Art üben demzufolge keinen oder allenfalls geringen Einfluß auf die Replikationsfähigkeit aus. Umgekehrt muß man erwarten, daß Sequenzänderungen in solchen Molekülbereichen, in denen Mutationen bisher nicht beobachtet werden konnten, die Replikationsfähigkeit erheblich stören.

Da die SP6-RNA-Transkripte von klonierter und gezielt mutierter Viroid-DNA synthetisiert werden, wird in einem folgenden Biotest mit einer einheitlichen Mutanten-RNA inokuliert. Damit läßt sich gezielt

die Weiterentwicklung dieser in vitro erzeugten Mutante verfolgen. Würde dieselbe Mutation in vivo entstehen, bliebe sie aufgrund der sofort einsetzenden Selektion möglicherweise unbemerkt. Deshalb kann mit Hilfe der künstlich hergestellten Mutanten entschieden werden, ob Sequenzänderungen "letal" oder "nachteilig" oder aber ganz ohne Einfluß auf die Replikabilität sind. Die Infektionsexperimente mit SP6-RNA-Transkripten von mutierten PSTV-RNAs zeigen, daß diese Prinzipien für die weitgehende Konservierung der Primärstruktur der Viroide auch tatsächlich anwendbar sind.

Die auf ihre Infektiosität hin getesteten Mutanten lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens in drei Gruppen einteilen

(1) Das RNA-Transkript des Klones M13-DD5, mit einem Basenaustausch bei Nukleotid 82, erwies sich als nicht-infektiös, ebenso wie das Transkript von Klon pSP-Bs2(+), welches zwischen Nukleotid 104 und 105 eine Insertion von einem U besitzt. Offenbar ist in beiden Fällen die Replikation des inokulierten Transkriptes gestört.

Der Eingriff in die molekulare Struktur des PSTV-Moleküles führt daher zum Verlust der Infektiosität aller Mutanten dieser Gruppe.

(2) Im Falle der Inokulation mit den mutierten RNAs der Mutanten M13-SS7 und M13-OF1 wurden PSTV-Infektionen beobachtet. Die Sequenzanalyse zeigte jedoch, daß in beiden Fällen die Viroid-Nachkommenschaft mit der des PSTV-Isolates KF440-2 identisch war. Offenbar revertierten die inokulierten Mutanten-RNAs wieder in die ursprüngliche und daher besser adaptierte Wildtyp-RNA. Dies war insbesondere bei der Mutante OF1 überraschend, da diese Mutation speziell unter dem Gesichtspunkt eines möglichst geringen Einflusses auf die Sekundärstruktur ausgewählt worden war. Die Reversion der beiden mutierten PSTV-RNAs muß so interpretiert werden, daß die inokulierte RNA offenbar in geringem Maße zur Replikation befähigt ist. Während ihrer Vermehrung müssen dann neue Mutationen aufgetreten sein, darunter auch die Reversionsmutation. Da die inokulierte mutierte RNA bereits nach einem Infektionszyklus nicht mehr nachzuweisen war, muß der Selektionsvorteil der Revertante erheblich sein.

Bei dieser Gruppe von Mutanten werden sehr wahrscheinlich zentrale Funktionen der PSTV-RNA offenbar mehr oder weniger stark gestört, aber nicht gänzlich inaktiviert.

(3) Schließlich erwies sich die RNA der Mutante VM2 nicht nur als infektiös, sondern sie führte auch zu einer mutierten PSTV-Nachkommenschaft. Dieses auf künstliche Weise erzeugte PSTV-Isolat ließ sich auch phänotypisch von dem nicht mutierten PSTV-Stamm unterscheiden. Die Mutante besitzt nämlich eine stabilere VM-Region, die in Übereinstimmung mit dem Modell von Schnölzer et al. (1985) zu weniger ausgeprägten Krankheitssymptomen führt.

Mutationen vom Typ der Mutante VM2 bilden eine dritte Gruppe von Mutanten, die nicht nur stabil sind, sondern auch auf die Replikation der PSTV-RNA keinen nennenswerten Einfluß besitzen. Solche Mutationen können jedoch andererseits den Grad der Virulenz, d.h. die Intensität der erzeugten Krankheitsymptome, eines Viroides beeinflussen.

Die Infektionsexperimente mit den mutierten PSTV-RNAs bestätigten damit den durch Sequenzvergleich von verschiedenen Isolaten abgeleiteten Befund, daß Basenaustausche lediglich innerhalb der VM-Region "toleriert" werden, d.h. also an einer Stelle, wo sie auch natürlicherweise auftreten. Andere Bereiche des Viroidmoleküles sind für Sequenzänderungen "tabu". Diese Beobachtungen stimmen somit völlig mit den bereits publizierten Resultaten von Mutagenese-Experimenten bei anderen Viroiden überein. So berichteten Ishikawa et al. (1986), daß die Infektiosität der HSV-DNA zerstört wurde, sobald sie bestimmte Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen innerhalb der HSV-DNA veränderten. Im Gegensatz zu diesen relativ ungezielten Mutationen konnten Owens et al. (1986) bei PSTV zeigen, daß auch der Austausch des Nukleotides C_{284} in U_{284} die Infektionsfähigkeit zerstörte. Interessanterweise wurden schließlich doch bei Kartoffelpflanzen Infektionen erhalten, nachdem die mutierte PSTV-DNA stromabwärts von dem starken 35 S-Promotor aus Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) in das Ti-Plasmid eingefügt wurde. Nach der Transformation der Pflanzen mit dem rekombinanten Ti-Plasmid und Integration der PSTV-DNA in das Genom

kam es zu Infektionen. Allerdings bestand auch hier die PSTV-Nachkommenschaft aus revertierter RNA. Dieser Fall zeigt sehr deutlich, daß PSTV äußerst empfindlich auf Änderungen seiner Sequenz reagiert. Denn das neu eingeführte U-Nukleotid bei Position 284 sollte bis zu einem gewissen Grad noch immer in der Lage sein, mit dem Nukleotid G_{76} auf dem "oberen" Strang wechselzuwirken, so wie dies beim C_{284} des "Wildtyp"-PSTV der Fall ist. Außerdem existiert ein U-Nukleotid an genau der vergleichbaren Position in den drei verwandten Viroiden CEV,CSV, und TASV.

6.3 Resümee und Perspektive

Die in der vorliegenden Dissertation erzielten Resultate sowie die verschiedenen inzwischen publizierten Ergebnisse von anderen Gruppen zeigen, daß man noch weit davon entfernt ist, im Detail zu verstehen, auf welche Weise die Viroid-RNA-Moleküle so komplexe biologische Vorgänge wie die Infektion und ihre Replikation bewerkstelligen bzw steuern. Weiterhin ist es noch völlig unklar, über welche molekulare Wirkungskette die Viroide innerhalb der von ihnen infizierten Pflanze ihren pathogenen Effekt auslösen und worauf ihre Wirtsspezifität beruht.

Die geschilderten Infektionsversuche und die Eingriffe in die Primärstruktur des PSTV zeigen jedoch, daß es möglich ist, mit Hilfe kombinierter biochemischer und gentechnologischer Methoden einen experimentellen Zugang zur Lösung dieser Probleme zu erhalten. Dabei stellte sich heraus, daß verschiedene funktionelle Domänen innerhalb des Viroid-RNA-Moleküls existieren, die für die Prozessierung, die Replikation und Pathogenität wichtig sind. Anhand der vorliegenden Ergebnisse können jetzt weitere gezielte Eingriffe in die Struktur der Viroide durchgeführt werden, die ganz sicher zu einem vertieften Verständnis dieser ungewöhnlichen pathogenen Moleküle führen werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Mit Hilfe des Einsatzes biochemischer, gentechnologischer und molekularbiologischer Methoden wurde die Beziehung zwischen der molekularen Struktur von Viroiden und ihren biologischen Funktionen am Beispiel des Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt :

(1) Durch die Konstruktion von geeigneten oligomeren Kopf-Schwanz-verknüpften PSTV-DNA-Klonen war es möglich, PSTV-RNA in vitro zu synthetisieren. Diese RNA kann als hervorragende Hybridisierungsprobe mit sehr hoher Spezifität und Sensitivität verwendet werden. Damit wurden die Voraussetzungen für einen spezifischen Nachweis der PSTV-RNA geschaffen, wie er für Studien der in vivo Replikation erforderlich ist..

(2) Es wurde festgestellt, daß verschiedene Formen von klonierter einzel- und doppelsträngiger PSTV-DNA nach mechanischer Inokulation auf Tomatenpflanzen PSTV-Infektionen auslösen können. Die inokulierte DNA wird dabei als solche nicht repliziert. Sie ist jedoch in der Weise infektiös, daß sie die Replikation von PSTV-RNA induziert.

(3) Infektionsversuche mit subgenomischen PSTV-DNA-Fragmenten haben gezeigt, daß solche DNAs in vivo zu oligomeren Formen ligiert werden können.

(4) In vitro synthetisierte oligomere PSTV (+) RNA besitzt die gleiche spezifische Infektiosität wie natürliche monomere PSTV-RNA.

(5) Die in vitro synthetisierte oligomere PSTV (-) RNA ist nicht-infektiös, obwohl vergleichbare (-) RNA-Formen während des normalen Replikationszyklus des PSTV auftreten.

(6) In vitro synthetisierte PSTV-RNA muß in einem definierten Bereich des PSTV-Genoms dupliziert sein, um nach mechanischer Inokulation Infektionen auslösen zu können. Der fragliche Molekülbereich liegt in der sogenannten "oberen zentralen konservierten Region" des PSTV-RNA-Moleküles. Die durchgeführten Experimente weisen darauf hin, daß diese Domäne an der Prozessierungsreaktion beteiligt ist, bei der aus linearen oligomeren Vorläufermolekülen die monomeren Viroid-Ringmoleküle, d.h. die eigentlichen Viroide, gebildet werden.

(7) Durch gezielte Eingriffe in die Primärstruktur des PSTV wurde festgestellt, daß Punktmutationen zu sehr unterschiedlichen Konsequenzen führen können. Sie können die Infektionsfähigkeit der Viroid-RNA gänzlich zerstören. Sie können ohne wesentlichen Einfluß auf die Infektions- und Replikationsfähigkeit bleiben, wobei dann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit durch erneute Mutation und Selektion in vivo Revertanten entstehen, welche die Mutante "überwachsen" und verdrängen. Punktmutationen können schließlich über mehrere Generationen hinweg erhalten bleiben und die Ausprägung der Krankheits-Symptome beeinflussen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahlquist,P., French,R. Janda,M. und Loesch-Fries,L.S. (1984).
Multicomponemt RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 7066-7070.

Ansorge,W., und de Maeyer,L. (1980).
Thermally stabilized very thin (0.02-0.3 mm) polyacrlamide gels for electrophoresis.
J. Chromatography, **202**, 45-53.

Bittner,M., Kupferer,P. und Morris,C.F. (1980).
Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets.
Anal. Biochem., **102**, 459-471.

Bolivar,F., Rodriguez,R.L., Greene,P.J., Betlach,M.C., Heynecker,H.L., Boyer,H.W., Crosa,J.H. und Falkow,S. (1977).
Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multi-purpose cloning system.
Gene, **2**, 95-113.

Branch;A.D. und Dickson,E. (1980).
Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by Southern hybridisation.
Virology, **104**, 10-16.

Branch,A.D., und Robertson,H.D. (1984).
A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs.
Science (Wash.), 223, 450-455.

Branch,A.D., Robertson,H.D. und Dickson,E. (1981).
Longer-than-unit-length viroids minus strands are present in RNA from infected plants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6381-6385.

Branch,A.D., Robertson,H.D., Greer,P., Gegenheimer,P., Peebles,C. und Abelson,J. (1982).
Cell-free circularisation of viroid progeny by an RNA ligase from wheat germ.
Science (Wash.), 217, 1147-1149.

Butler,E.T. und Chamberlin,M.J. (1982).
Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase.
J. Biol. Chem., 257, 5772-5778.

Carter,P. (1986).
Site directed mutagenesis.
Biochem. J., 237, 1-7.

Carter,P., Bedouelle,H. und Winter,G. (1985).
Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors.
Nucleic Acids Res., 13, 4431-4442.

Chan,H.W., Israel,M.A., Garon,C.F., Rowe,W.P., und Martin,M.A. (1979).
Molecular cloning of polyoma virus DNA in Escherichia coli: Lambda phage vector system.
Science (Wash.), 203, 887-892.

Chen,W., Tien,B., Zhu,Y.X. und Liu,Y. (1983).
Viroid-like RNAs associated with Burdock stunt disease.
J. Gen. Virol., 64, 409-414.

Collins,J. (1980).
Instability of palindromic DNA in Escherichia coli.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. USA., **Volume XLV**, 409-416.

Cress,D.E., Kiefer,M.C. und Owens,R.A. (1983).
Construction of infectious potato spindle tuber viroid cDNA clones.
Nucleic Acids Res. , **11**, 6821-6835.

Dagert,M. und Ehrlich,S.D. (1979).
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells.
Gene, **6**, 23-28.

Dawson,W.O., Beck,D.L., Knorr,D.A. und Grantham,G.L. (1986).
cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 1832-1836.

Diener,T.O. (1984).
Portrait of viruses: the viroids.
Intervirology, **22**, 1-16.

Diener,T.O. (1986).
Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 58-62.

Filipowicz,W. und Gross,H.J. (1984).
RNA ligation in eukaryotes.
TIBS **9**, 67-84.

Fied,M., Klein,B., Murray,K., Greenaway,P., Tooze,J., Boll,W. und Weissmann,C. (1979).
Infectivity in mouse fibroblasts of polyoma DNA integrated into plasmid pBR322 or lambdoid phage DNA.
Nature (London), **279**, 811-816.

Friedrich,H. (1980).
Genkartierung und Klonierung von ribosomaler DNS höherer Pflanzen. Bindungsstudien mit RNS-Polymerase I und Ansätze zur Strukturgenisolierung aus Sojabohnenzellen.
Dissertation, Universität Tübingen.

Goldman,D. und Merril,C.R. (1982).
Silverstaining of DNA in polyacrylamide gels: Linearity and effect of fragment size.
Electrophoresis, **1**, 24-26.

Green,M.R., Maniatis,T., und Melton,D.A. (1983).
Human b-globin pre-mRNA synthesized in vitro is accurately spliced in Xenopus oocyte nuclei.
Cell, **32**, 681-694.

Gross,H.J., Domdey,H., Lossow,C., Jank,P., Raba,M., Alberty,H. und Sänger,H.L. (1978).
Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid.
Nature (London) , **273**, 203-208.

Gross,H.J., Liebl,U., Alberty,H., Krupp,G., Domdey,H., Ramm,K. und Sänger,H.L. (1981).
A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only.
Biosci. Reports, **1**, 235-241.

Gross,H.J., Krupp,G., Domdey,H., Raba,M., Alberty,H., Lossow,C.H., Ramm,K. und Sänger,H.L. (1982).
Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid.
Eur.J.Biochem., **121**,249-257.

Hadidi,A., Cress,D.E. und Diener,T.O. (1981).
Nuclear DNA from uninfected or potato spindle tuber viroid-infected tomato plants contains no detectable sequences complementary to cloned double-stranded viroid cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA , **78**, 6932-6935.

Hanahan,D. (1983).
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.
J. Mol. Biol., **166**, 557-580.

Haseloff,J. und Symons,R.H. (1981).
Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure.
Nucleic Acids Res., **9**, 2741-2752.

Haseloff,J., Mohamed,N.A., und Symons,R.H. (1982).
Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts.
Nature (London), **299**, 316-321.

Hashimoto,J. und Machida,Y. (1985).
The sequence in the potato spindle tuber viroid required for its cDNA to be infective: A putative processing site in viroid replication.
J. Gen. Appl. Microbiol., **31**, 551-561.

Hashimoto,J., Suzuki,K. und Uchida,T. (1985).
Infectivity of artificially nicked viroid molecules.
J. Gen. Virol., **66**, 1545-1551.

Herold,T. (1986).
Optimierung des spezifischen Nachweises von PSTV (+) und (-) RNA durch molekulare Hybridisierung und teilweise Charakterisierung einer zellulären RNA aus gesunden Tomatenpflanzen, die mit PSTV (+) RNA hybridisiert.
Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Holland,J., Spindler,K., Grabau,E., Nichol,S. und van der Pol,P. (1982).
Rapid evolution of RNA genomes.
Science (Wash.), **215**, 1577-1585.

Holmes,D.S. und Quigley,M. (1981).
A rapid method for the preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. , **114**, 193-197.

Howell,S.H., Walker,L.L. und Dudley,R.K. (1980).
Cloned cauliflower mosaic virus DNA infects turnips (Brassica rapa).
Science (Wash.), **208**, 1265-1267.

Hutchins,C.J., Keese,P., Visvader,J.E., Rathjen,P.D., McInnes,J.E. und Symons,R.H. (1985).
Comparison of multimeric plus and minus forms of viroids and virusoids.
Plant Mol. Biol., **4**, 293-304.

Ishikawa,M., Meshi,T., Ohno,T., Okada,Y., Sano,T., Ueda,I. und Shikata,E. (1984).
A revised replication cycle for viroids: The role of longer than unit lenth RNA in viroid replication.
Mol. Gen. Genet., **196**, 421-428.

Ishikawa,M., Meshi,T., Okada,Y., Sano,T., und Shikata,E. (1985).
In vitro mutagenesis of infectious viroid cDNA clone.
J. Biochem., **98**, 1615-1620.

Kassavetis,G.A., Butler,E.T., Roulland,D. und Chamberlin,M.J. (1982).
Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase.
J. Biol. Chem., **257**, 5779-5788.

Kiefer,M.C., Owens,R.A., und Diener,T.O. (1983).
Structural similarities between viroids and transposable genetic elements.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 6234-6238.

Kikuchi,Y., Kazimierz,T., Filipowicz,W., Sänger, H.L., und Gross,H.J., (1982.
Circularisation of linear viroid RNA via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester bonds by a novel RNA ligase from wheat germ and Chlamydomonas.
Nucleic Acids Res., **10**, 7521-7529.

Kim,J.P., Kaplan,H.S. und Fry,K.E. (1982).
Characterization of an infective molecular clone of the B-tropic, ecotropic BL/Ka(B) murine retrovirus genome.
J.Virol., **44**, 217-225.

Konarska,M., Filipowicz,W., Domdey,H. und Gross,H.J. (1981).
Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phophodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ.
Nature (London), **293**, 112-116.

Konarska,M., Filipowicz,W., and Gross,H.J. (1982).
RNA ligation via 2'-phosphomonoester, 3',5' phosphodiester linkage: requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotid kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 1474-1478.

Kramer,B., Kramer,W., und Fritz,H.-J. (1984).
Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair System of E.coli.
Cell, **38**, 879-887.

Kramer,W., Drutsa,V., Jansen,H.-W., Kramer,B., Pflugfelder,M. und Fritz,H.-J. (1984).
The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction.
Nucleic Acids Res., **12**, 9441-9456.

Krieg,,P.A., und Melton,D.A. (1984).
Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs
Nucleic Acids Res., **12**, 7057-7070.

Lebeurier,G., Hirth,L., Hohn,T. und Hohn,B. (1980).
Infectivities of native and cloned DNA of cauliflower mosaic virus.
Gene, **12**, 139-146.

Lebeurier,G., Hirth,L., Hohn,B. und Hohn,T. (1982).
In vivo recombination of cauliflower mosaic virus DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2932-2936.

Little,P.F.R. (1984).
RNA probes prepared in vitro.
Nature (London), **309**, 191.

Maniatis,T., Fritsch,E.F. und Sambroock,B. (1982).
Molecular Cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

Maxam,A.M. und Gilbert,W. (1980).
Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages.
Methods Enzymol., **65**, 499-560.

McClean,A.P., (1931).
Bunchy top disease of tomato.
South African Dept. Agric. Sci. Bull., **100**, 36.

McMaster,G.M., und Carmichael,G.G. (1977).
Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4835-4838.

Meinkoth,J. und Wahl,G. (1984).
Hybridization of nucleic acids on solid supports.
Anal. Biochem., **138**, 267-284.

Melton,D.A., Krieg,P.A., Rebagliati,M.R., Maniatis,T., Zinn,K. und Green,M.R. (1984).
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridisation probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.
Nucleic Acids Res., **12**, 7035-7056.

Meshi,T., Ishikawa,M., Okada,Y., Ohno,Y., Sano,T., Ueda,I. und Shikata,E. (1984).
Double-stranded cDNAs of hop stunt viroid are infectious.
J.Biochem., **95**, 1521-1524.

Meshi,T., Ishikawa,M., Watanabe,Y., Yamaya,J., Okada,Y., Sano,T., und Shikata,E. (1985).
The sequence necessary for the infectivity of hop stunt cDNA clones.
Mol. Gen. Genet., **200**, 199-206.

Meshi,T., Ishikawa,M., Motoyoshi,F., Semba,K. und Okada,Y. (1986).
In vitro transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 5043-5047.

Messing,J. (1979).
A multi-purpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13.
Recombinant DNA Technical Bulletin NIH Publication No 79-99, 2, 43-48.

Messing,J. (1983).
New M13 vectors for cloning.
Methods Enzymol., **101**, 20-78.

Messing,J., Crea,R. und Seeburg,P.H (1981).
A system for shotgun DNA sequencing.
Nucleic Acids Res., **9**, 309-321.

Messing,J. und Viera,J. (1982).
A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments.
Gene, **19**, 269-276.

Mohamed,N.A. und Thomas,W. (1980).
Viroid-like properties of an RNA species associated with the sunblotch disease of avocados.
J. Gen. Virol., **46**, 157-167.

Mühlbach,H.-P., und Sänger,H.L. (1979).
Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin.
Nature (London), **278**, 185-188.

Mühlbach,H.-P., Faustmann,O. und Sänger,H.L. (1983).
Conditions of optimal growth of a PSTV-infected potato cell suspension and detection of viroid-complementary-longer-than-unit-length RNA in these Cells.
Plant. Mol. Biol., **2**, 239-247.

Müller,W. und Kütemeier,G. (1982).
Size fractionation of DNA fragments ranging from 20 to 30000 base pairs by liquid/liquid chromatography.
Eur.J.Biochem., **128**, 231-238.

Nielsen,D.A. und Shapiro,D.J (1986).
Preparation of capped RNA transcripts using T7 RNA polymerase
Nucleic Acids Res., **14**, 5936.

Norrander,J., Kempe,.T und Messing,J. (1983).
Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis.
Gene, **26**, 101-106.

Öfverstedt,L.G., Hammarström,K., Balgobin,N., Hjerten,S., Pettersson,U., und Chattopadhyaya,J. (1984).
Rapid and quantitative recovery of DNA fragments from gels by displacement electrophoresis (isotachophoresis).
BBA, **782**, 120-126.

Ohno,T., Takamatsu,N., Meshi,T. und Okada,Y. (1983).
Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy.
Nucleic Acids Res., **11**, 6185-6197.

Ohno,T., Ishikawa,M., Takamatsu,N., Meshi,T. Okada,Y., Sano,T. und Shikata,E. (1984).
In vitro synthesis of infectious RNA molecules from cloned hop stunt viroid complementary DNA.
Proc. Japan Acad., **59**, 251-254.

O'Rear,J.J., Mizutani,S., Hoffman,G., Fiandt,M. und Temin,H.M. (1980).
Infectious and noninfectious recombinant clones of the provirus of SNV differ in cellular DNA and are apparently the same in viral DNA.
Cell, **20**, 423-430.

Owens,R.A. und Diener,T.O. (1982).
RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 113-117.

Owens,R.A., Hammond,R.W., Gardner,R.C., Kiefer,M.C., Thompson,S.M. und Cress,D.E. (1986).
Site-specific mutagenesis of potato spindle tuber viroid cDNA.
Plant. Mol. Biol., **6**, 179-192.

Racaniello,V.R. und Baltimore,D. (1981).
Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammaliam cells.
Science (Wash.), **214**, 916-919.

Rackwitz,H.R., Rohde,W. und Sänger,H.L. (1981).
DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-lenth copies.
Nature (London) , **291**, 297-301.

Randles,J.W. Rillo,E.P. und Diener,T.O. (1976).
The viroid-like structure and cellular location of anomalous RNA associated with the cadang-cadang disease.
Virology, **74**, 128-139.

Riesner,D. und Gross,H.J. (1985).
Viroids.
Ann.Rev. Biochem, **54**, 531-564.

Riesner,D., Henco,K., Rokohl,U., Klotz,G., Kleinschmidt,A.K., Gross,H.J., Domdey,H. und Sänger,H.L. (1979).
Structure and structure formation of viroids.
J. Mol. Biol., **133**, 85-115.

Riesner,D., Steger,G., Schumacher,J., Gross,H.J., Randles,J.W. und Sänger,H.L. (1983).
Structure and function of viroids.
Biophys. Struct. Mech., **9**, 145-170.

Rohde,W. und Sänger,H.L. (1981).
Detection of complementary RNA intermediates of viroid replication by Northern blot hybridization.
Biosci. Rep., **1**, 327-333.

Romaine,C.P. und Horst,R.K. (1975).
Suggested viroid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease.
Virology, **64**, 86-95.

Sänger,H.L. (1979).
Viroide, eine neue Klasse molekularer Krankheitserreger.
Mitt. Ber. Robert-Koch Stiftung, **1**, 71-99.

Sänger,H.L. (1982).
in Parthier,B. und Boulter,D. (Edt.). Encyclopedia of Plant Physiology new series, vol. 14B Nucleic Acids and Proteins in Plants II: Biology, Structure, Functions und Possible Origin of Viroids, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 368-454.

Sänger, H.L. (1984).
in Mahy,B.W.J. und Pattison,J.R. (Edt.). The Microbe, Part I Viruses, Society for General Microbiology Symposium 36,: Minimal Infectious Agents: The Viroids, Cambridge University Press, 281-334.

Sänger,H.L., Klotz,G., Riesner,D., Gross,H.J. und Kleinschmidt,A.K. (1976).
Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3852-3856.

Sänger,H.L., Ramm,K., Domdey,H., Gross,H.J. und Riesner,D. (1979).
Conversion of circular viroid molecules to linear strands.
FEBS Lett., **99**, 117-122.

Sanger,F.S., Nicklen und Coulsen,A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-termination inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 5463-5467.

Sano,T., Uyeda,I., Shikata,E., Ohno,T. und Okada,Y. (1984).
Nucleotide sequence of cucumber pale fruit viroid: homology to hop stunt viroid.
Nucleic Acids Res., **12**, 3427-3434.

Sano,T., Ohshima,K., Hataya,T., Uyeda,I., Shikata,E., Chou,T.-G., Meshi,T. und Okada,Y. (1986).
A viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the United States and Japan.
J. Gen. Virol., **67**, 1673-1678.

Schaffner,W. (1980).
Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 2163-2167.

Schnölzer-Rackwitz,M. (1985).
Beziehung zwischen der molekularen Struktur des Viroids der Kartoffelspindelknollensucht (PSTV) und seiner Pathogenität.
Dissertation, Universität Ulm.

Schnölzer,M., Haas,B., Ramm,K., Hofmann,H. und Sänger,H.L. (1985).
Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV).
EMBO J., **4**, 2181-2190.

Schumacher,J., Sänger,H.L. und Riesner,D. (1983).
Subcellular locaization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue.
EMBO J.,**2**, 1549-1555.

Scott,M.L., McKereghan,K., Kaplan,H.S. und Fry,K.E. (1981).
Molecular cloning and partial characterization of unintegrated linear DNA from gibbon ape leukemia virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 4213-4217.

Spiesmacher,E., Mühlbach,H.-P., Schnölzer,M., Haas,B. und Sänger,H.L. (1983).
Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells.
Biosci. Rep., **3**, 767-774.

Spiesmacher,E., Mühlbach,H.-P., Tabler,M. und Sänger,H.L. (1985).
Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors.
Biosci. Rep., **5**, 251-265.

Stanley,J. (1983).
Infectivity of the cloned geminivirus genome requires sequences from both DNAs.
Nature (London), **305**, 643-645.

Stellwag,E.J. und Dahlberg,A.E. (1980).
Electrophoretic transfer of DNA, RNA and proteins onto diazobenzyloxymethyl (DBM)-paper.
Nucleic Acids Res., **8**, 299-317.

Symons,R.H. (1981).
Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure.
Nucleic Acids Res., **9**, 6527-6537.

Tabler,M. (1983).
Klonierung und Sequenzierung von Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) cDNA.
Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Tabor,S. und Richardson,C.C. (1985).
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 1074-1078.

Takahashi,T. und Diener,T.O. (1975).
Potato spindle tuber viroid XIV. Replication in nuclei isolated from infected leaves.
Virology, **64**, 106-114.

Taniguchi,T., Palmieri,M. und Weissmann,C. (1978).
QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host.
Nature (London), **274**, 223-228.

Thomas,P.S. (1980).
hybridisation of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5201-5205.

Viera,J. und Messing,J. (1982).
The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene, **19**, 259-268.

Visvader,J.E., und Symons,R.H. (1983).
Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid.
Virology, **130**, 232-237.

Visvader,J.E., und Symons,R.H. (1985).
Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity.
Nucleic Acids Res., **13**, 2907-2920.

Visvader,J.E., Gould,A.R., Bruening,G.E. und Symons,R.H. (1982).
Citrus exocortis viroid: nucleotide sequence and secondary structure of an Australian isolate.
FEBS Lett., **137**, 288-292.

Visvader,J.E., Forster,A.C. und Symons,R.H. (1985).
Infectivity and in vitro mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicates the site of processing of viroid precursors.
Nucleic Acids Res., **13**, 5843-5856.

Wahl,G.M, Stern,M., und Stark,G.R. (1979).
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzylmethyl-paper and rapid hybridisation by using dextran sulfate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3683-3687.

Wallace,R.B., Schold,M., Johnson,M.J., Dembek,P. und Itakura,K.(1981).
Oligonukleotid directed mutagenesis of the human b-globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA.
Nucleic Acids Res., **9**, 3647-3656.

Walter,B. (1981).
Un viroide de la tomate en Afrique de l'ouest: identite avec le viroide du "potato spindle tuber".
Comptes rendues hebdomadaire des sceances de l'Academie des sciences, **292**, Serie III, 537-542.

Zaitlin,M., Niblett,C.L., Dickson,E. und Goldberg,R.B. (1980).
Tomato DNA contains no detectable regions complementary to potato spindle tuber viroid as assayed by solution and filter hybridization.
Virology, **104**, 1-9.

Zelcer,A., Zaitlin,M., Robertson,H.D. und Dickson,E. (1982).
Potato spindle tuber viroid-infected tissues contain RNA complementary to the entire viroid.
J. Gen. Virol., **59**, 139-148.

20. Juni 1956	geboren in Stuttgart Vater : Erwin Tabler Mutter : Ingeborg Tabler
1963 - 1966	Grundschule in Ludwigshafen
1966 - 1975	Staatl. Max-Planck-Gymnasium in Ludwigshafen
Mai 1975	Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig
Juli 1975- Oktober 1976	Zivildienst in Ludwigshafen
Oktober 1976- März 1982	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
April 1979	Vordiplom Biochemie
1980 - 1981	Einjähriger Aufenthalt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
März 1982	mündliche Diplom-Hauptprüfung in Biochemie
April 1982 - Juni 1983	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Sänger. Titel der Arbeit : Klonierung und Sequenzierung von Potato Spindle Tuber Viroid cDNA.
Juli 1983 - Dezember 1986	Anfertigung der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Sänger

Meine akademischen Lehrer waren :

E.	Bayer	D.	Kamp	H.L.	Sänger
R.	Bernstein	H.	Mauser	W.	Seyffert
G.	Gerisch	D.	Mecke	J.	Sonnenbichler
K.	Grell	H.	Metzner	J.	Strähle
M.	Hanack	H.-P.	Mühlbach	G.	Weitzel

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45